

Untersuchungen
der lichtinduzierten Enzyme
der Carotinoidbiosynthese
von *Neurospora crassa*

Elisabeth Seigner

Disbui. München

1988

Untersuchungen der lichtinduzierten Enzyme der Carotinoid-
biosynthese von Neurospora crassa

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereiches Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Diplom-Biologin
Elisabeth Seigner
aus Landshut

Juni 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rau
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 2. August 1988

Meiner Mutter
Meiner Tante



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554801_0068

Seite:	
I. Einleitung.....	1
II. Material und allgemeine Methoden.....	11
1. Anzucht von <i>Neurospora crassa</i>	11
2. Charakterisierung der carotinoidsynthetisierenden Enzyme.....	12
2.1. Induktion und Synthese der Enzyme.....	12
2.2. Gewinnung der membrangebundenen Enzymfraktion...	13
2.3. Solubilisierung der Proteine.....	14
2.4. Bestimmung des Proteingehaltes.....	15
2.5. Membranlipide.....	15
2.5.1. Extraktion der Lipide.....	15
2.5.2. Analyse der Lipide.....	16
2.5.2.1. Chromatographische Auftrennung..	16
2.5.2.2. Bestimmung der Phospholipidmenge	17
2.5.2.3. Quantifizierung der einzelnen Lipide und der Fettsäure-	
komponenten.....	17
2.6. Rekonstitution der solubilisierten Proteine.....	18
2.7. In-vitro Test der Carotinoidsyntheseaktivität...	19
2.7.1. ^{14}C -Mevalonsäure als Ausgangssubstrat....	20
2.7.1.1. Verseifen des R,S-(2- ^{14}C)-	
Mevalonsäurelactons.....	20
2.7.1.2. GGPP-lieferndes System.....	20
2.7.1.3. Kombiniertes Enzymtest.....	21
2.7.2. ^{14}C -Phytoen als Substrat.....	22
2.7.2.1. Enzymatische Synthese von ^{14}C -Phytoen.....	22
2.7.2.2. Aufreinigung der ^{14}C -Phytoen-	
fraktion.....	22
2.7.2.3. Enzymtest mit ^{14}C -Phytoen-	
liposomen.....	23

2.8. Extraktion und Bestimmung der Syntheseprodukte..	24
2.8.1. Aceton-Methanol-Extraktion.....	24
2.8.2. Chloroform-Methanol-Extraktion.....	25
2.8.3. Dünnschichtchromatographie.....	26
2.8.4. Messung der Radioaktivität.....	26
3. Lichtinduzierte Änderungen von in-vitro und in-vivo translatierten Proteinen und ihre Korrelation mit der Carotinoidbiosynthese.....	27
3.1. Extraktion der Nukleinsäuren.....	27
3.2. Isolierung von Poly A ⁺ -RNA.....	28
3.3. In-vitro Translation.....	29
3.4. Auftrennung der Translationsprodukte mittels Gelelektrophorese.....	31
3.4.1. Isoelektrische Fokussierung.....	31
3.4.2. Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	32
3.4.3. Fluorographie.....	34
3.5. Gewinnung der ³⁵ S-markierten Membranproteine....	35
3.6. Auftrennung der Membranproteine durch Gel- elektrophorese.....	35
III. Ergebnisse.....	37
1. <u>Charakterisierung der carotinoidsynthetisierenden</u> <u>Enzyme</u>	37
1.1. Untersuchung der membrangebundenen Enzym- aktivitäten.....	37
1.1.1. Carotinoidbiosynthese im kombinierten Testsystem mit ¹⁴ C-MVA.....	37
1.1.2. Bestimmung von Enzymaktivitäten mit ¹⁴ C-Phytoen.....	42

1.1.2.1. Cofaktorenbedarf.....	43
1.1.2.2. Lipidabhängigkeit.....	47
1.2. Solubilisierung der carotinoidsynthetisierenden Enzyme und ihre Charakterisierung.....	49
1.2.1. Versuche zur Solubilisierung der Phytoen- synthase mit hohen Salzkonzentrationen...	49
1.2.2. Solubilisierung der Phytoensynthase mit CHAPS.....	52
1.2.2.1. Einfluß der CHAPS-Konzentration auf die Solubilisierung von Membranproteinen und Lipiden....	52
1.2.2.2. Einfluß von CHAPS-Monomeren auf das Kürbissystem und die membrangebundenen Enzyme.....	57
1.2.2.3. Bestimmung der Phytoensynthase- aktivität nach Solubilisierung..	59
1.2.3. Reaktivierung der solubilisierten Phytoensynthase.....	63
1.2.3.1. Rekonstitutionstechnik.....	64
1.2.3.2. Einfluß der Protein- und Lipid- menge.....	65
1.2.3.3. Kinetik.....	70
1.2.3.4. Optimierte Testbedingungen.....	72
1.2.4. Versuche zur Solubilisierung der weiteren carotinoidsynthetisierenden Enzyme.....	74

2. <u>Lichtinduzierte Änderungen von in-vitro und in-vivo translatierten Proteinen im Zusammenhang mit der Carotinoidbiosynthese</u>	78
2.1. Die Wirkung der Photoinduktion der Carotinoidbiosynthese auf RNAs.....	79
2.1.1. Versuchsdurchführung.....	79
2.1.2. Nachweis lichtinduzierter Aktivitätsänderungen einzelner m-RNAs.....	80
2.2. Die Wirkung der Photoinduktion der Carotinoidbiosynthese auf Membranproteine.....	86
2.2.1. Versuchsdurchführung.....	87
2.2.2. Lichtbedingte Veränderungen in der Zusammensetzung der Membranproteine.....	88
IV. Diskussion.....	91
V. Zusammenfassung.....	111
VI. Literatur.....	115

Verwendete Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriposphat
Butyl-PBD	2-(4-t-Butylphenyl)-5-(4-biphenyl)-1,2,3,-oxadiazol
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]- 1-propansulfonat
CMC	kritischen Micellenkonzentration
DEP	Diethylpyrocarbonat
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtSH	Mercaptoethanol
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
GPP	Geranylpyrophosphat
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPP	Isopentenylpyrophosphat
M	molar (mol/l)
mM	millimolar (mmol/l)
m-RNA	messenger-Ribonukleinsäure
MVA	Mevalonsäure
NAD(H)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidierte (reduzierte) Form
NADP(H)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, oxidierte (reduzierte) Form
N. crassa	Neurospora crassa
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PEP	Phosphoenolpyruvat
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-fluorid
PPO	2,5-Diphenyloxazol
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan



I. EINLEITUNG

Die Biosynthese von Carotinoiden unterliegt bei vielen Organismen einer Photoregulation; bei höheren Pflanzen ist auch die Synthese von Chlorophyllen, Anthocyanen und anderen Flavonoiden vielfach lichtabhängig (Lit. siehe Mohr et al., 1974; Rau, 1975). Wie bei allen durch Licht regulierten Entwicklungsprozessen von Pflanzen und Mikroorganismen stellt sich auch bei dieser Regulation die Frage, auf welcher Ebene der Prozeß durch Licht gesteuert wird.

Für eine Aufklärung der Reaktionsmechanismen, die der Photoregulation der Carotinoidbiosynthese zugrundeliegen, eignen sich besonders heterotrophe Organismen wie einige Pilze und Bakterien, die eine obligate Photoregulation der Pigmentbildung aufweisen. Durch das Fehlen des Photosyntheseapparates ist bei diesen Organismen im Gegensatz zu höheren Pflanzen keine Überlagerung der lichtinduzierten Carotinoidsynthese zu erwarten (Goodwin, 1967; Schnarrenberger und Mohr, 1970). Aufgrund intensiver Studien (Lit.-Übersicht s. Batra, 1971; Rau, 1977; 1985) ließen sich innerhalb der Reaktionskette der lichtinduzierten Carotinoidsynthese drei zeitlich getrennte Abschnitte erkennen: Temperaturunabhängige Photoinduktion, vermutliche de novo Synthese von carotinoidbildenden Enzymen via Genderepression und die Bildung der Farbstoffe selbst. Als Photorezeptor für die sauerstoffabhängige Induktion wird ein Flavin oder ein Flavoprotein diskutiert (Lit. siehe Rau, 1967; Song, 1980; Reger, 1988). Über die Photoperzeption und die Signaltransduktion liegen im wesentlichen nur Spekulationen vor (Lit. siehe Gressel und Rau, 1983). Konkretere Vorstellungen bestehen über die beiden nachfolgenden Reaktionsschritte. Zahlreiche Untersuchungen bestärken die Hypothese, daß die Photoregulation der Carotinoidbiosynthese auf der Ebene der Transkription stattfindet. Bereits 1972 haben Lang und Rau auf eine mögliche de novo Synthese carotinoidbildender Enzyme hingewiesen. Die Akkumulationskinetiken der Pilze *Fusarium aquaeductuum* und *Neurospora* zeigen, daß zwischen Lichtinduktion und Bildung der ersten Carotinoide eine lag-

Phase von 30 Minuten liegt (Rau et al., 1968; Rau und Rau-Hund, 1977). Durch Studien mit Transkriptions- und Translationshemmstoffen (Rau et al., 1968; Rau und Rau-Hund, 1977; Jochum, 1977), wie auch durch den Nachweis eines induktionsbedingten Anstiegs der relativen Menge an Poly A⁺-RNA (Schrott, 1977) wurde die Vorstellung gestützt, daß bei der Steuerung der Carotinoidbiosynthese eine differentielle Genexpression vorliegt (Mohr, 1966; Lang und Rau, 1972). Schließlich konnten bei *Fusarium* und *Neurospora* sowohl auf der Ebene der m-RNA, wie auch auf der Ebene der Membranproteine, die den Hauptanteil der Carotinoidsyntheseaktivität ausmachen, lichtbedingte Veränderungen nachgewiesen werden (Mitzka-Schnabel et al., 1984; 1985). Dazu wurden nach Isolierung von m-RNAs und Umsetzung ihrer Translationsaktivität die in-vitro translatierten Proteine, ebenso wie die in-vivo translatierten ³⁵S-markierten Membranproteine elektrophoretisch aufgetrennt und auf induktionsbedingte Veränderungen im Polypeptidmuster hin untersucht. Neu oder verstärkt auftretende Polypeptidspots zeigten eine gewisse Korrelation mit der Pigmentbildung. Einen direkten Nachweis einer lichtinduzierten de novo Synthese spezifischer an der Carotinoidsynthese beteiligter Enzyme erbrachten erstmals Spurgeon et al., 1979 und Mitzka-Schnabel und Rau, 1981 mit Hilfe eines zellfreien Systems. Ein schlüssiger Beweis dafür, daß die durch Licht induzierte de-novo Synthese der Enzyme auf der Ebene der Transkription reguliert wird, konnte bis jetzt aber nicht erbracht werden.

Der Biosyntheseweg der Isoprenoide (Abb. 1) ist in Grundzügen aufgeklärt (Davies, 1975; Lit.-Übersicht s. Goodwin, 1980). Die Carotinoid- und Sterinsynthese erfolgt über gemeinsame Vorstufen. Mevalonsäure (MVA), ein C₆-Körper tritt als erster spezifischer Metabolit des Terpenoidweges auf, nur die 3-R-MVA ist jedoch biologisch aktiv. MVA wird anschließend durch Kinasen stufenweise phosphoryliert und durch eine Decarboxylase in den C₅-Körper Isopentenylpyrophosphat (IPP) überführt. Eine Isomerase setzt IPP und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) ins Gleichgewicht. Die Synthese des

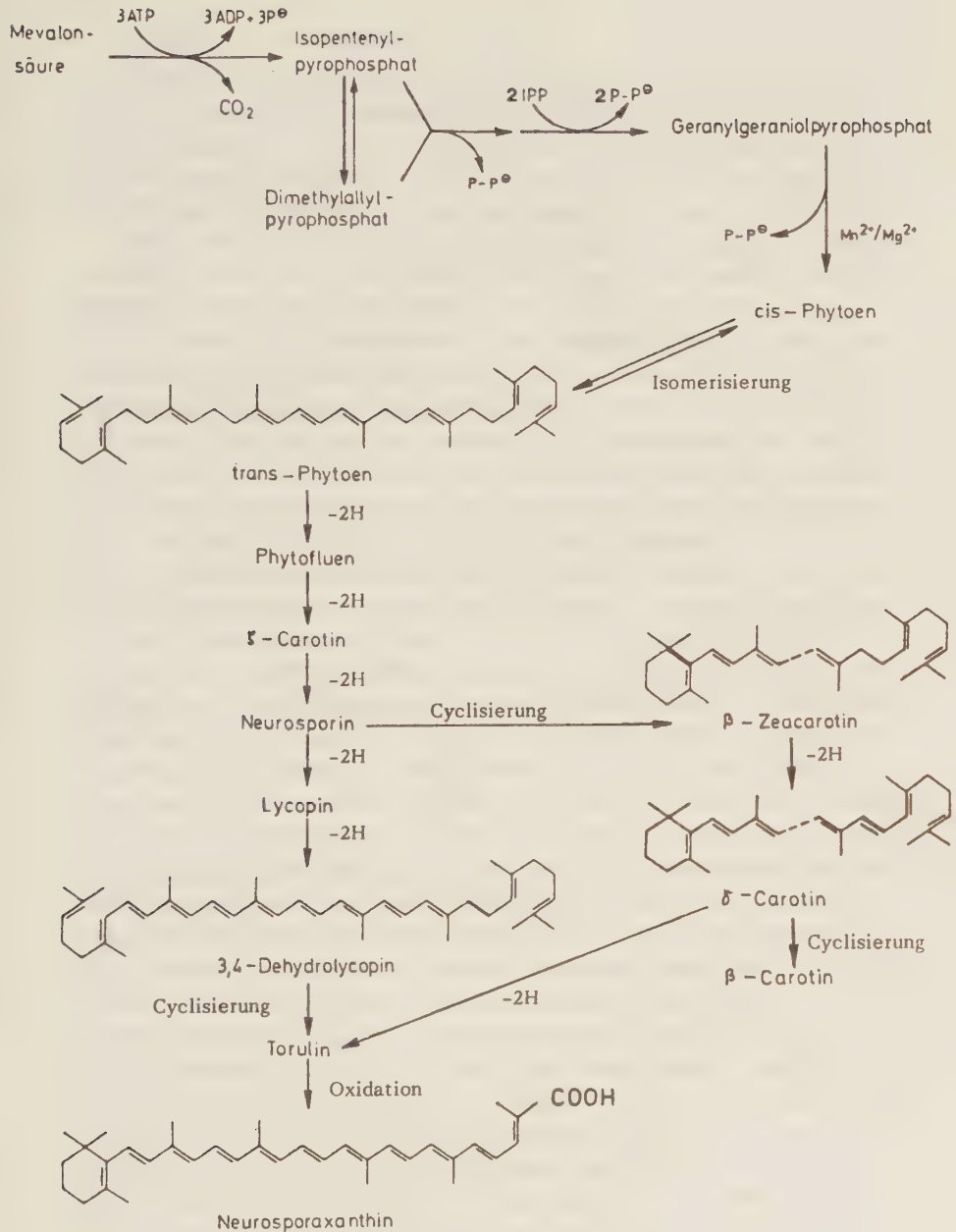


Abb. 1 :

C₁₀-Körpers Geranylpyrophosphat (GPP) aus IPP und DMAPP wird durch eine spezifische Prenyltransferase katalysiert. Durch Addition weiterer C₅-Einheiten wird zunächst Farnesylpyrophosphat (FPP, C₁₅) und nachfolgend Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP, C₂₀) gebildet. Diese C₂₀-Verbindung ist schließlich Ausgangssubstanz für eine Dimerisierungsreaktion, die zur ersten C₄₀-Verbindung mit dem Gerüst der Carotinoide - dem Lycopersen oder Phytoen - führt. Die Bildung von Prälycopersen bzw. Präphytoen-pyrophosphat konnte bei verschiedenen Organismen nachgewiesen werden (Barnes et al., 1973; Johnson et al., 1974; Qureshi et al., 1974). Durch stufenweise Dehydrierung, Ringschluß und Oxidation entstehen aus dem relativ gesättigten Phytoen die einzelnen Carotinoide; der Biosyntheseweg verläuft nach dem sog. Porter-Lincoln-Schema (Porter und Anderson, 1967).

Eine der Voraussetzungen für den Nachweis einer licht-regulierten Genexpression ist die Isolierung der an der Carotinoidsynthese beteiligten Enzyme; dies ist aber bisher nur sehr unvollständig gelungen. Enzyme, die die frühen Syntheseschritte innerhalb des Isoprenoidweges bis hin zur Bildung des GGPPs katalysieren, wie z.B. die MVA-Kinase, MVA-Decarboxylase und Prenyltransferase(n) konnten in mehreren Organismen nachgewiesen bzw. isoliert und z.T. aufgereinigt werden (Lit.-Übersicht s. Goodwin, 1980); offensichtlich liegen diese Enzyme in löslicher Form vor (Dorsey et al., 1966; Oster und West, 1968; Ogura et al., 1972; Johnson et al., 1974; Rilling, 1979; Mitzka-Schnabel und Rau, 1981) oder als sog. periphere Membranproteine (Kreuz et al., 1982). Die Enzyme der Carotinoidbiosynthese wie die Phytoensynthase und die Phytoen-metabolisierenden Enzyme, die eine cis-trans Isomerase-, 4 Dehydrogenase-, zwei Cyclase- sowie eine Oxidasereaktion katalysieren, sind dagegen nur bei wenigen Organismen genauer untersucht.

Bei höheren Pflanzen konnten aus Tomatenfruchtplastiden (Shah et al., 1986; Lit.-Zusammenfassung s. Maudinas et al., 1977), aus Chromoplasten von Capsicum (Camara, 1982) und Narcissus (Kreuz et al., 1982) lösliche oder leicht mit der Membran

assoziierte Enzymkomplexe isoliert und teilweise aufgereinigt werden, die ausgehend von IPP die Synthese von Phytoen katalysieren.

Die Vorstellung von einem löslichen oder nur schwach an die Membran gebundenen Multienzymkomplex, der MVA oder IPP in Phytoen umsetzt, konnte sowohl bei einigen Bakterien, so z.B. bei *Halobacterium cutirubrum* (Kushwaha et al., 1976), *Mycobacterium spec.* (Gregonis and Rilling, 1973; Johnson, 1974) und bei *Flavobacterium R 1560* (Britton et al., 1980) wie auch beim Pilz *Phycomyces blakesleeianus* (Bramley, 1985) verifiziert werden.

Hingegen erscheint in Spinatplastiden die Lokalisation des Phytoensynthasekomplexes vom Entwicklungszustand des Plastiden abzuhängen. Im etiolierten Spinatplastiden ist der Phytoensynthasekomplex löslich, während im ausdifferenzierten Chloroplasten eine stärkere Bindung dieses Enzymkomplexes mit der "Envelope"-Membran vorliegt (Lütke-Brinkhaus et al., 1982; 1987).

Im Pilz *Neurospora crassa* konnte die Phytoensynthaseaktivität eindeutig in einer "Membranfraktion" lokalisiert werden, die Plasmamembranen und insbesondere ER enthält (Mitzka-Schnabel und Rau, 1981). Die membrangebundene Phytoensynthase stellt hier das Bindeglied dar zwischen dem im Cytoplasma ablaufenden Teil des Carotinoidbiosyntheseweges und der strikt an Membranen gekoppelten Metabolisierung von Phytoen. Es besteht somit ein gravierender Unterschied zu den oben genannten Phytoensynthasekomplexen, bei denen stets die gesamte Reaktion vom IPP oder MVA bis zum Phytoen von einem löslichen bzw. peripheren Membranprotein-Komplex katalysiert wird.

Während zumindest bei löslichen "Phytoensynthasekomplexen" noch eine teilweise Aufreinigung und Charakterisierung der beteiligten Enzyme möglich war, sind die vom Phytoen ausgehenden enzymatischen Reaktionen noch wenig aufgeklärt. Bei den meisten bisher untersuchten Organismen konnten zumindest Dehydrogenase-, cis-trans Isomerase- und Cyclaseaktivitäten ausgehend von MVA, IPP oder Phytoen nachgewiesen werden. Während für Tomatenfruchtplastiden lediglich die Beteiligung

dieser Reaktionsschritte bei der Umsetzung von Phytoen und Lycopin nachgewiesen wurden (Porter and Spurgeon, 1979), konnten bei anderen Organismen hinsichtlich Lokalisation und Aktivität der beteiligten Enzyme nähere Aussagen getroffen werden.

Aufgrund von Solubilisierungsversuchen scheinen die Enzyme, die Phytoen weitermetabolisieren, integrale Membranproteine zu sein (Kreuz et al., 1982; Bramley et al., 1985; Camara, 1985). Eine Ausnahme bildet hier *Halobacterium spec.*, bei dem die Bildung von ungesättigteren Carotinoiden von einer löslichen Enzymfraktion katalysiert wird (Kushwaha et al., 1974).

Im Spinatchloroplasten wurde eine mit der "Envelope"-Membran assoziierte Phytoendehydrogenaseaktivität nachgewiesen (Lütke-Brinkhaus et al., 1982). Bei den Pilzen *Aspergillus giganteus* (El-Jack et al., 1987) und bei *Phycomyces blakesleeana* (Bramley et al., 1975; Bramley et al., 1977; De La Concha et al., 1983) konnte nach in-vitro Supplementierung mit einem Phytoenakkumulierenden Stamm von *Phycomyces* oder nach Zugabe von ^{14}C -MVA oder radioaktiv markierten Carotinoidvorstufen die Aktivität der einzelnen integralen Membranproteine nachgewiesen werden.

Um die einzelnen membrangebundenen enzymatischen Schritte bei der Synthese der ungesättigteren Carotinoide untersuchen zu können, ist eine effektive Solubilisierung und eine dadurch mögliche Anreicherung der beteiligten Enzyme Voraussetzung. Aus den Chromoplasten von *Capsicum* konnte eine Lycopincyclase solubilisiert werden (Camara et al., 1986). Neue Aspekte im Hinblick auf die Biosynthese von α - und β -Carotin eröffneten Untersuchungen der solubilisierten und rekonstituierten Enzymaktivitäten aus dem Chromoplasten von *Narcissus* (Beyer, 1988); die Befunde deuten daraufhin, daß bei der in-vitro Synthese von α - und β -Carotin der cis-trans Isomerisierungszustand der Intermediate auf der Stufe des ζ -Carotins und Lycopins entscheidend ist. Desweiteren konnte eine periphere Oxidoreductase charakterisiert werden, die nur in Gegenwart von Sauerstoff aktiv ist und bei der Desaturierung des Phytoens mit der integralen Dehydrogenase kooperiert.

Auch bei *Neurospora crassa* sind die Enzymaktivitäten für die Synthese von den ungesättigteren Carotinoiden membrangebunden. Sie konnten ebenso wie die Phytoensyntheseaktivität in einer "Membranfraktion" nachgewiesen werden (Mitzka-Schnabel, 1978; Mitzka-Schnabel und Rau, 1981). *Neurospora crassa* ist mit Ausnahme von *Aspergillus giganteus* (El-Jack et al., 1987) der einzige eukaryontische Organismus mit strikt photo-kontrollierter Carotinoidbiosynthese und ist daher besonders geeignet, um die Details im Reaktionsmechanismus der photo-induzierten Pigmentbildung aufzuklären und um eine de novo Synthese der carotinoidbildenden Enzyme nach Lichtinduktion nachzuweisen.

Wie bereits erwähnt konnte die Lokalisation der carotinoid-bildenden Enzyme von Mitzka-Schnabel (1978) aufgeklärt werden. Über die einzelnen enzymatischen Schritte ausgehend von GGPP und über die Organisation der daran beteiligten Enzyme ist dagegen noch relativ wenig bekannt. Bei allen anderen untersuchten Organismen ist es bisher noch nie gelungen, die "eigentliche" Phytoensynthese - das Enzym, das die Synthese der ersten C₄₀-Verbindung mit dem Grundgerüst der Carotinoide katalysiert - vom gesamten Phytoensynthese-Komplex abzutrennen (Spurgeon et al., 1984). Somit konnte nie die "eigentliche" Phytoensyntheseaktivität erfaßt werden, sondern stets nur die gesamte Synthesesequenz vom IPP bzw. von MVA zum Phytoen, die durch den löslichen oder nur schwach mit der Membran assoziierten Phytoensynthesekomplex katalysiert wird. Bei *Neurospora* dagegen ist eine Abtrennung dieses Enzyms vom löslichen, im Cytoplasma lokalisierten GGPP-bildenden Enzymsystems bereits auf Grund seiner Assoziation mit der Membran gegeben. Der Einwand, daß andererseits die Phytoensynthese in engem Kontakt mit den Phytoen-metabolisierenden, ebenfalls in der Membranfraktion lokalisierten Enzymen steht und dadurch eine Abtrennung der Phytoensynthese erschwert ist, kann durch Befunde der Carotinoidsynthese unter in-vivo Bedingungen entkräftet werden. Da selbst unter in-vivo Bedingungen (Mitzka und Rau, 1977) Phytoen stark akkumuliert und nur 46 % in die ungesättigteren Carotinoide weiter umgesetzt wird, ist ein

enger Zusammenschluß der Phytoensynthese mit den Phytoen-metabolisierenden Enzymen in Art eines Komplexes sehr unwahrscheinlich. Bisher konnte nur der gesamte Phytoen-synthase-Komplex von *Narcissus* angereichert werden (Beyer, 1987); dagegen sollte es bei *Neurospora* möglich sein, zum ersten Mal die "eigentliche" Phytoensynthese zu isolieren und anzureichern, um sie für immunologische Studien verwenden zu können. Dies ist besonders im Zusammenhang mit der Aufklärung der Photoregulation der Carotinoidsynthese von großer Bedeutung.

Auch im Hinblick auf eine Untersuchung und Aufklärung der enzymatischen Schritte, die vom Phytoen ausgehen, scheint *Neurospora* ein erfolgversprechendes System zu sein. Im Vergleich zu anderen eukaryontischen, heterotrophen Organismen wie *Phycomyces* oder *Aspergillus* sollte bei *Neurospora* eine Trennung der einzelnen Dehydrogenase-, Isomerase-, Cyclase- und Oxidase-Aktivitäten besser möglich sein, zumal in-vivo- (Mitzka und Rau, 1977; Seigner, L., 1984) und in-vitro-Befunde (Mitzka-Schnabel, 1978; Eiberger, 1983) darauf hindeuten, daß die Kooperativität zwischen den einzelnen Enzymen weit weniger ausgeprägt ist als bei *Aspergillus* (El-Jack et al., 1987) und *Phycomyces* (De La Guardia et al., 1971; Cerda-Olmedo, 1987). Während nämlich bei *Phycomyces* fast ausschließlich β -Carotin und bei *Aspergillus* neben Lycopin vor allem β -Carotin - das Endprodukt des Carotinoidbiosyntheseweges - synthetisiert wird, werden bei *Neurospora* in relativ hohem Maße die verschiedenen Intermediate akkumuliert. Die einzelnen Enzyme des Multienzymkomplexes wie er von De La Guardia (1971) postuliert wird, der die Desaturierung von Phytoen wie auch die Cyclisierungsschritte katalysiert, konnten bei *Neurospora* weniger miteinander assoziiert sein. Damit könnten vielleicht die einzelnen Phytoenmetabolisierenden Enzyme leichter voneinander getrennt werden. Dadurch wären bei *Neurospora* auch Studien möglich, die Aussagen über die Photoregulation der Phytoenmetabolisierenden Enzyme zulassen. Nach bisherigen Ergebnissen (Spurgeon et al., 1979; Mitzka-Schnabel und Rau, 1981; Harding et al., 1981) ist die Phytoensynthese bei

Neurospora das erste Enzym, das unter strikter Photokontrolle steht und möglicherweise nach Lichtinduktion via Gen-derepression de novo synthetisiert wird. Die Frage, ob eine "sequentielle" Enzyminduktion, wie sie von Lang und Rau (1972) diskutiert wurde, vorliegt oder ob nach Photoinduktion bestimmte Enzymgruppen koordiniert induziert werden, wie dies bei der Flavonoidbiosynthese von Hahlbrock (1981) nachgewiesen wurde, könnte somit geklärt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, einen Beitrag zum Nachweis einer photoregulierten de novo Synthese der carotinoidbildenden Enzyme über eine transkriptionale Kontrolle zu leisten; dabei sollte auch eine weitere Charakterisierung dieser Enzyme angestrebt werden. Für die Lösung dieser Probleme erschienen zwei Ansatzpunkte erfolgversprechend: Einerseits sollten die carotinoidsynthetisierenden Enzyme solubilisiert, rekonstituiert und charakterisiert werden und andererseits sollten lichtbedingte Intensitätsänderungen im Proteinmuster zeitlich mit der Biosynthese der Carotinoide korreliert werden.

Um einzelne Schritte der Biosynthese untersuchen zu können, sollte zunächst die in-vitro Syntheseaktivität der membran-gebundenen Enzyme optimiert werden. Die Carotinoidsynthesefähigkeit der membrangebundenen Enzyme wurde in den bisherigen Untersuchungen in einem kombinierten in-vitro Testsystem überprüft, wobei ein GGPP-synthetisierendes System aus dem Endosperm von Cucurbita pepo eingesetzt wurde. Obwohl bereits hinsichtlich bestimmter biochemischer Parameter eine Optimierung der in-vitro Carotinoidsynthese angestrebt worden war (Stark, 1982; Eiberger, 1983), zeigten die Neurospora-Enzyme geringe in-vitro Carotinoidsyntheseaktivität. Da im kombinierten Enzymtest mit ^{14}C -MVA auch die Phytoen-metabolisierung zu den ungesättigteren Carotinoiden sehr gering war, sollte weiterhin versucht werden, durch Einsatz von ^{14}C -Phytoen als direktes Substrat die in-vitro Synthese der ungesättigteren Carotinoide von der GGPP- und Phytoenbildung zu entkoppeln und die Aktivität dieser membrangebundenen

Enzyme deutlich zu steigern. Für diese Untersuchungen der vom Phytoen ausgehenden Dehydrogenierungs-, Isomerisierungs- und Cyclisierungs- und Oxidationsschritte mußten erst die in-vitro Testbedingungen erarbeitet werden.

Um eine Analyse der einzelnen Schritte der photoregulierten Carotinoidbiosynthese und um eine Charakterisierung der daran beteiligten Enzyme zu erreichen, wurde eine Solubilisierung der membrangebundenen Enzyme angestrebt. Zielsetzung war es dabei, die Enzyme unter Erhaltung ihrer Struktur von der Membran zu lösen und sie zu reaktivieren, um so eine Steigerung der solubilisierten Enzymaktivitäten zu erreichen.

Für den zweiten Ansatzpunkt sollte versucht werden, Kinetiken der lichtbedingten Intensitätsänderungen im Proteinmuster zu erstellen. Diese Kinetiken sollten dann eine präzisere Korrelation der bereits in früheren Untersuchungen (Mitzka-Schnabel et al., 1984) gefundenen lichtinduzierten Proteine mit der Carotinoidbiosynthese ermöglichen. Dazu sollten zum einen nach Isolierung von stadienspezifischen messenger-RNAs die in-vitro Translationsprodukte näher untersucht werden. Zum anderen sollten die in-vivo translatierten ³⁵S-Puls-markierten Membranproteine auf lichtinduzierte Veränderungen hin analysiert werden.

II. MATERIAL UND ALLGEMEINE METHODEN

1. Anzucht von Neurospora

Versuchsobjekt war eine Wildstamm von *Neurospora crassa* (Strain ATCC 10816; Herkunft: Centralbureau voor Schimmeldkulturen, Baarn; Holland), der bereits in früheren Untersuchungen (Rau et al., 1968; Mitzka-Schnabel, 1977; Schrott, 1980) verwendet wurde. Die gefriergetrockneten Konidien der Stammkultur wurden bei -24°C aufbewahrt und alle 12 Monate als frisches Animpfmateriel verwendet. Die Anzucht erfolgte in folgender Weise: Zur Bildung von Luftmyzel mit Konidiosporen wurden gefriergetrocknete Konidien bzw. junges Myzel mit einem kleinen Agarblöckchen auf festen Nähragarboden (40 ml in 250 ml Erlenmeyerkolben) überimpft und die Kolben 3 Tage bei 32°C bebrütet und anschließend noch 2-3 Tage bei Raumtemperatur belassen. Eine Sporensuspension erhielt man durch Abschwemmen mit einer sterilen 1%igen Lösung von Tween 40 und nachfolgender Filtration über eine mit Glaswolle gestopfte Säule. Durch Tween wurde auch eine erneute Konidienbildung unterbunden.

Für die Submerskulturen wurde 400 ml flüssiges Nährmedium nach Vogels (in 1,8 l Fernbachkolben) mit $2,5 \times 10^9$ Sporen beimpft (Zusammensetzung des Vogelsmediums siehe Seigner L., 1984). Anschließend wurde die Submerskultur auf einer Schüttelmaschine mit ca. 70 Schüttelbewegungen pro min. im Dunkeln und bei konstanter Temperatur ($27^{\circ}\text{C} \pm 1$) bebrütet.

Das feste Agarmedium bestand aus Fries'schen Nährsalzen (nach Vogel, 1956) (0,5 % Ammoniumtartrat; 0,1 % KH_2PO_4 ; 0,05 % $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 0,01 % NaCl ; 0,01 % $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$; 0,1 % NH_4NO_3) ergänzt mit 1,5 % Glycerin, 0,25 % Glucose, 0,25 % Malzextrakt (gereinigt von Diamalt, München), 0,05% Difco Bacto-Pepton und 0,25 % Hefeextrakt. Durch Zugabe von 2 % Agar (Serva) wurde das Nährmedium verfestigt.

2. Charakterisierung der carotinoidsynthetisierenden Enzyme

2.1. Induktion und Synthese der Enzyme

Das 20 Stunden alte Myzel wurde durch Abfiltrieren der Nährlösung mittels eines Büchnertrichters unter mehrmaligem Waschen mit Aqua dest. gesammelt und in dest. Wasser resuspendiert (0,75 l/Fernbachkolben); durch kräftiges Schütteln wurde eine weitgehend homogene Suspension erreicht. Für den Versuchsansatz wurden 75 ml der Pilzsuspension (ca. 5-6 g Frischgewicht) in 250 ml Gaswaschflaschen pipettiert, in denen bereits 75 ml Puffer-Glucose-Lösung (Endkonzentration: 16 mM KH_2PO_4 und 2 % (w/v) Glucose) vorlagen. Durch die Überführung des Pilzes in dieses Minimalmedium wurde ein weiteres Wachstum des Myzels verhindert. Eine Akkommodation von zwei Stunden bei 20°C im Dunkeln an diese "step-down"-Bedingungen ist im Hinblick auf eine nachfolgende optimale Photoinduktion der Carotinoidsynthese erforderlich (Schrott, 1980). Sämtliche Arbeitsvorgänge wurden bei einem für die Lichtinduktion unwirksamen, schwachen Rotlicht (Leuchtstoffröhren Philips TL 40 W; Lichtfarbe 15; davor rote Plexiglasscheiben von Röhm und Haas, Darmstadt, Nr. 501) durchgeführt. Zur Belichtung wurden die Gaswaschflaschen zwischen 2 Blaulichtaggregate aus je 3 horizontal untereinander angeordneten Leuchtstoffröhren (Interneon, Röhm Filter 625) aufgestellt. Die Belichtungszeit betrug 128 min. Während der Dauer der Belichtung wurde die Pilzsuspension mit Sauerstoff durchströmt und dadurch zusätzlich eine gleichmäßige Belichtung der Hyphen gewährleistet. Die Temperatur der Pilzsuspension wurde mit Hilfe eines Wasserbades (Wasserküvette mit Plexiglas Nr. 218) nahezu konstant ($20^\circ\text{C} \pm 1$) gehalten. Unter dem Einfluß der verwendeten Lichtmenge (128 Minuten; 28 W/m^2) und der Zeit der Synthese der carotinoidbildenden Enzyme im Myzel konnte nach der Herstellung eines zellfreien Extraktes eine ausreichende Aktivität der entsprechenden Enzyme nachgewiesen werden (Mitzka-Schnabel und Rau, 1981).

Eine orange Färbung des Pilzmyzels durch bereits gebildete Carotinoide nach Abschluß der Belichtung diente zudem als optische Kontrolle für das Vorhandensein von carotinoid-synthetisierenden Enzymen im Myzel.

2.2. Gewinnung der membrangebundenen Enzymfraktion

Nach Abschluß der Belichtung wurde das bereits orange gefärbte Pilzmyzel von der Versuchslösung abfiltriert, viermal mit kaltem dest. Wasser gewaschen, um Reste von Tween zu entfernen und mit Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl (Serva); 200 mM Nicotinsäureamid (Serva); 2 mM DTT (Roth); pH 7,8) nachgewaschen. Die feuchten Myzelpads wurden zur Bestimmung des Frischgewichtes gewogen. Alle folgenden Arbeitsgänge wurden bei 4°C in Eis durchgeführt. Das Myzel (ca. 40 g Frischgewicht/Fernbachkolben) wurde in einer Reibschale mit 40 ml eiskaltem Extraktionspuffer und mit nachgereinigtem Seesand (Merck; ca. 5 g pro 20 g Frischgewicht) mit einem Pistill mindestens 8 min. lang kräftig zu einem homogenen Brei zerrieben. Anschließend wurde das Homogenat durch eine doppelte Lage Gaze gepreßt.

Das dadurch erhaltene Rohhomogenat wurde durch differentielle Zentrifugation nach dem in Abb. 2 dargestellten Schema weiter fraktioniert.

Das Rohhomogenat wurde zunächst 15 min. lang bei $13\,000 \times g_{av}$ zentrifugiert (Beckmann-Kühlzentrifuge; Rotor JA 20). Das Sediment (13 KP) wurde verworfen und somit intakte Zellen, Zellbruchstücke und subzelluläre Partikel wie Zellkerne und Mitochondrien entfernt. Anschließend wurde der 13 KS-Überstand 2 Std. bei $115\,000 \times g_{av}$ zentrifugiert (WKF P 50 K; Rotor 8x38 bzw. Contron; Rotor TFT 70) zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde abdekantiert und verworfen.

Frühere Untersuchungen (Mitzka-Schnabel, 1978) hatten gezeigt, daß sowohl die Mitochondrienfraktion (13 KP), wie auch die lösliche Proteinfraction (115 KS) nur geringe Enzymaktivität für die Carotinoidsynthese aufweisen.

Das kräftig orange gefärbte Sediment (115 KP), das verschiedene Membranfraktionen wie Plasmamembranen und Endoplasmatisches Reticulum enthält, wurde mit einigen ml Tris-Puffer (50 mM Tris-HCl; 2mM DTT; pH 7,8) gewaschen und bis zum Versuchstag bei -60°C aufbewahrt.

Am Versuchstag wurden die aufgetauten Membranpellets mit einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem per Hand vorsichtig in 50 mM Tris-HCl-Puffer (2 mM DTT; pH 7,8) resuspendiert (Proteinkonzentration 10-15 mg/ml).

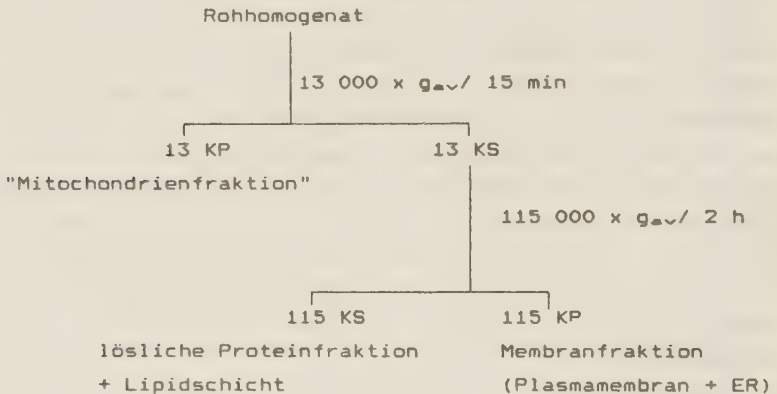


Abb. 2:

Schema für die differentielle Zentrifugation des Rohhomogenats von *Neurospora crassa*

2.3. Solubilisierung der Proteine

Zur Solubilisierung wurden die bei -60°C eingefrorenen Membranpellets mit einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem per Hand vorsichtig in Tris-Puffer (50 mM Tris-HCl; 2 mM DTT; pH 7,8) resuspendiert und für die Solubilisierung eine

Proteinkonzentration von 9,5 mg/ml eingestellt. Zum Schutz vor Proteasen wurde PMSF (Phenylmethansulfonyl-Fluorid) [Sigma] in einer Endkonzentration von 1 mmol/l zugegeben (frische ethanolische Lösung) (Gaertner, 1976; Neupert, 1983).

Nach Zugabe von festem CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat) [Sigma] in einer Endkonzentration von 10 mmol/l (CMC: 6-8 mM) wurde der Solubilisierungsansatz unter N₂-Atmosphäre 60 min. lang bei 0-4°C unter Rühren inkubiert. Die Abtrennung der solubilisierten Proteinfraction von noch membrangebundenem Material erfolgte bei 120 000 x g_{av} 2,5 Stunden lang in einer Ultrazentrifuge (Contron, Rotor TFT 70). Der klare, rötlich gefärbte Überstand, der die solubilisierten Proteine enthält ("10 mM-Solubilisat") wurde vorsichtig abpipettiert und das Sediment ("10 mM-Pellet") in Tris-Puffer resuspendiert. Beide Fraktionen wurden nachfolgend im in-vitro Test auf ihre Carotinoidsynthesefähigkeit hin untersucht.

2.4. Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry et al., 1951. Als Proteinstandard diente eine Lösung von Rinder-serumalbumin.

2.5. Membranlipide

2.5.1. Extraktion der Lipide

Die Extraktion der Lipide erfolgte nach der Methode von Folch (s. Rouser and Fleischer, 1967) mit Chloroform : Methanol (2 : 1 v/v) bei 21°C.

Für die Gewinnung der Membranlipide wurde die aus belichtetem Myzel gewonnene Membranfraction (115 KP) 3-4 Mal mit Chloroform/Methanol ausgeschüttelt und zentrifugiert (5 min.; 5 000 x g_{av}; 5 min.; Beckmann; Rotor JA 20) bis das Pellet farblos erschien. Die gesammelten Chloroformphasen, die die

extrahierten Lipide enthalten, wurden nachfolgend 2-3 Mal mit Wasser gewaschen, um restliches Protein auszufällen. Bei allen Extraktions- und Waschschritten wurde die Trennung zwischen wässriger und Chloroform-Phase durch Zentrifugation (5 000xg) beschleunigt und so die Bildung von Mikroemulsionströpfchen an der Interphase weitgehend verhindert.

Ebenso erfolgte die Extraktion der Lipide aus dem "10 mM-Solubilisat" bzw. dem "10 mM-Pellet" (vgl. Abschnitt II.2.3.). Die vorgereinigten Lipide wurden in Chloroform aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C unter N₂-Atmosphäre im Dunkeln aufbewahrt.

2.5.2. Analyse der Lipide

2.5.2.1. Chromatographische Auftrennung

Die extrahierten Lipide der 3 verschiedenen Fraktionen (Membranfraktion, "10 mM-Solubilisat" und "10 mM-Pellet") wurden über ein- und zwei-dimensionale Dünnschichtchromatographie genauer untersucht.

Die Auftrennung erfolgte an Kieselgel-Dünnschichtplatten (HPTLC-Fertigplatten, Kieselgel 60, 10 x 10 cm), die vor Gebrauch 30 min. bei 110°C aktiviert wurden. Die in Chloroform aufgenommenen Lipide wurden unter einem leichten N₂-Strom aufgetragen und in einem Laufmittelgemisch von Toluol : Aceton : H₂O (60:182:17 v/v) nach Henkelmann (persönliche Mitteilung) in einer gesättigten Kammer 1-dimensional aufgetrennt. Die Entwicklungszeit lag bei ca. 20 min.

Für die 2-dimensionale Auftrennung der Lipide wurden folgende Laufmittelgemische nacheinander verwendet: Chloroform : Methanol : 25 % NH₃ (65:25:5 v/v) für die 1. Dimension; Chloroform : Aceton : Methanol : Essigsäure : H₂O (56:20:10:10:4 v/v) für die 2. Dimension (Hallermeier und Neupert, 1974). Zwischen der 1. und 2. Dimension wurden die Platten ca. 1,5 h lang unter einem schwachen N₂-Strom im Dunkeln getrocknet. Die Laufzeit betrug 2 x 30 min.

Um die einzelnen Lipide sichtbar zu machen wurden die unter N_2 getrockneten Platten mit einem Reagens nach Henkelmann ($Fe-Mn-H_2SO_4$ -Sprühreagens) gleichmäßig besprüht und bei $150^\circ C$ getrocknet. Die Lipide erschienen als bräunliche Spots auf der Platte. Zusätzlich wurden die Lipide durch Joddampf sichtbar gemacht.

Zur Identifizierung einzelner Lipide wurde in der 1. Dimension ein Nadelblattextrakt mit bekannter Lipidzusammensetzung cochromatographiert. Bei der 2-dimensionalen Technik wurde der Nadelblattextrakt mitaufgetrennt. Weiter erfolgte eine Zuordnung der einzelnen Spots durch Vergleich mit dem Lipidmuster, das bei der Auftrennung von mitochondrialen Lipiden von *Neurospora crassa* bei Verwendung desselben Laufmittelsystems erhalten wurde (Hallermeyer und Neupert, 1974).

2.5.2.2. Bestimmung der Phospholipidmenge

Die quantitative Bestimmung der Phospholipide erfolgte nach der Methode von Gerlach und Deuticke (1963) über eine Phosphatbestimmung. Als Phosphatstandard diente eine Phosphorstandardlösung von Sigma ($0,65 \text{ mmol/l}$ anorg. Phosphat). Als Umrechnungsfaktor für eine Gewichtsbestimmung der Phospholipide bei Eukaryonten wurde $1 \text{ } \mu\text{mol PL} = 760 \text{ } \mu\text{g PL}$ verwendet.

2.5.2.3. Quantifizierung der einzelnen Lipide und der Fettsäurekomponenten

Für die mengenmäßige Bestimmung der einzelnen Lipidkomponenten wurden die Lipide der Membranfraktion und des "10 mM-Solubilisats" zunächst über eine Dimension nach der oben beschriebenen Methode (nach Henkelmann; s. Abschnitt II.2.5.2.1.) aufgetrennt. Um die einzelnen Lipidkomponenten [Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerin (PG), Phosphatidylinosit (PI), Phosphatidylserin (PS), Cardiolipin (C)] dauerhaft als

bräunliche Spots sichtbar zu machen, wurden nach dem Lauf die Platten mit dem oben genannten Fe-Mn-Sulfat-Reagens besprüht. Eine Quantifizierung der einzelnen Lipidkomponenten wurde schließlich mit einem Densitometer versucht (Vitatron Scanner bei einer Detektorwellenlänge von 583 nm).

Die gaschromatographische Analyse der Lipidfettsäuren der Membranfraktion und des "10 mM-Solubilisats" wurde freundlicherweise von Herrn Henkelmann durchgeführt. Die Fettsäuren wurden dabei als Methylester bestimmt (Morrison and Smith, 1964). Säule: CP TM SIL 58 (10%), 2 m x 1/8", Edelstahl (gepackt); Gaschromatograph: Varian Gaschromatograph 1860-4.

2.6. Rekonstitution der solubilisierten Enzyme

Die Rekonstitution der solubilisierten Enzyme erfolgte nach der Sonifiertechnik bzw. der Freeze-thaw-Sonifiertechnik. Dazu wurden Membranlipide (1-20 mg Phospholipide; Extraktion und Quantifizierung s. Abschnitt II.2.5.1. und II.2.5.2.) in Reagenzgläser pipettiert und das Lösungsmittel mit Stickstoff abgeblasen. Der an der Glaswand entstehende Lipidfilm wurde nachfolgend 1 Stunde lang im Vakuum einer Ultrazentrifuge getrocknet, um Spuren des Lösungsmittels zu entfernen. Für die Insertion der solubilisierten Enzyme in die Lipid-vesikel wurden 2 verschiedene CHAPS-Konzentrationen (5,3 bzw. 10 mmol/l) geprüft.

Für eine Rekonstitution bei 5,3 mmol/l CHAPS (<CMC) wurde der getrocknete Lipidfilm zuerst mit 0,35-1,41 ml Puffer (50 mM Tris-HCl; 2 mM DTT; pH 7,8) eine Stunde in Eis vorinkubiert und anschließend die Lipide durch 3-4 Sonifizierungspulse von je 5 sec. dispergiert (Sonifizierstab Branson B12; Mikrospritze; output Stufe 5; 40-50 Watt). Die dadurch entstandenen Liposomen wurden sofort schnell mit 0,4-1,6 ml "10 mM-Solubilisat" (1-4 mg solubilisiertes Protein) gemischt. Wurde die Rekonstitution dagegen bei 10 mmol/l CHAPS (>CMC) durchgeführt, so wurde das "10 mM-Solubilisat" (0,4-1,6 ml; 1-4 mg Protein) direkt auf den getrockneten Lipidfilm

pipettiert (s. Sandermann, 1982). Dadurch war es möglich die solubilisierten Proteine in Kontakt mit den Lipiden zu bringen, ohne dabei die Detergenzkonzentration zu verändern. Auch bei diesen Proben wurden die Lipide nach einer 1-stündigen Quellungsphase auf Eis durch 3-5 kurze Sonifizierungspulse in Lösung gebracht.

Die weiteren Schritte erfolgten unabhängig von der während der Rekonstitution eingestellten CHAPS-Konzentration bei beiden Ansätzen gleich.

Um die solubilisierten Proteine in die Lipidvesikel zu inserieren, wurde bei der Freeze-thaw-Technik das Protein-Lipid-Gemisch sofort nach dem Mischen in flüssigem N_2 eingefroren und anschließend über Nacht langsam in Eis oder bei Raumtemperatur innerhalb von 20-30 Minuten aufgetaut. Nach einem kurzen Sonifizierungspuls von maximal 10 sec. standen diese Proben zur Inkubation im in-vitro Test zur Verfügung.

Bei der Sonifizierungstechnik hingegen wurde die Insertion der Enzyme in die Lipidvesikel durch verlängerte Ultraschallbehandlungen von maximal 2 Minuten erreicht, ohne daß die Lipid-Protein-Mischung einem Freeze-thaw-Zyklus unterworfen wurde. Um eine Hitzedenaturierung zu verhindern wurde die Sonifizierungbehandlung durch mehrere Kühlphasen unterbrochen. Anschließend erfolgte ebenfalls die Überprüfung der Phytoensyntheseaktivität im in-vitro-Test.

2.7. In-vitro Test der Carotinoidsyntheseaktivität

Die Aktivität der carotinoidsynthetisierenden Enzyme wurde im zellfreien System mit Hilfe des Einbaus von Radioaktivität in die einzelnen Terpene überprüft.

Je nach Zielsetzung der einzelnen Untersuchungen wurde als radioaktiv markiertes Ausgangssubstrat ($2-^{14}C$)-Mevalonsäure oder ^{14}C -Phytoen als direktes Substrat im in-vitro Test eingesetzt.

2.7.1. ^{14}C -Mevalonsäure als Ausgangssubstrat

2.7.1.1. Verseifen des R,S-(2- ^{14}C)-Mevalonsäurelactons

Das Ausgangssubstrat ^{14}C -MVA, das im kombinierten Enzymtest durch Prenyltransferasen des Kürbisendosperms zu ^{14}C -GGPP umgesetzt wird, kann nur als Lacton (Amersham, Braunschweig) bezogen werden. Das Substrat mußte deshalb zunächst durch Verseifung aus dem Lacton freigesetzt werden (Britton und Goodwin, 1971): Das in Benzol gelöste (R,S- ^{14}C)-Mevalonsäurelacton wurde pro 1 mg mit 77 μmol KOH und 0,5 ml H_2O bei 50°C im Wasserbad verseift, das Lösungsmittel wurde dabei unter leichtem N_2 -Strom ausgetrieben und so das entstehende R,S-MVA-Isomerengemisch in die wässrige Phase gebracht. Nur die 3-R-MVA ist biologisch aktiv. Die spezifische Aktivität der verwendeten MVA lag bei 389 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ (51,4 mCi/mmol).

2.7.1.2. GGPP-lieferndes System

Reines radioaktiv markiertes GGPP ist biochemisch schwierig zu synthetisieren. Im Endosperm von unreifen Samen von Cucurbita pepo konnte ausgehend von ^{14}C -MVA eine hohe GGPP-Syntheseaktivität nachgewiesen werden (Graebe, 1969; Mende, 1976); deshalb wurde das GGPP-bildende System aus dem Endosperm von Cucurbita pepo als Substratlieferant für die Phytoensynthese von N. crassa im in-vitro Test eingesetzt.

Die Anzucht von Cucurbita pepo wurde im Bot. Garten durchgeführt. Aus den nicht völlig ausgereiften Früchten wurden die Samen entnommen, an der Spitze abgeschnitten und das halbfüssige Endosperm herausgedrückt, in 2ml Fraktionen gesammelt und bei -20°C gelagert. Das aufgetaute Endosperm wurde schonend mit einem Potter-Elvehjem-Gerät homogenisiert (400 U/min; 10 x 1) und schließlich 20 min. lang bei 35 000 x g_{av} (Beckmann; Rotor JA 20) zentrifugiert. Der resultierende 35 KS-überstand (pH 6,5), der GGPP-Syntheseaktivität aufweist, wurde über Membranfilter (Amicon, YM 30;

Amicon-Rührzelle) um den Faktor 3,75 konzentriert.

Dieses Konzentrat aus dem Kürbisendosperm wurde im Enzymtest für die ^{14}C -GGPP-Synthese aus ^{14}C -MVA eingesetzt.

2.7.1.3. Kombiniertes Enzymtest

Die im Kürbisendosperm enthaltene(n) Prenyltransferase(n) setzt(en) radioaktiv markierte ^{14}C -MVA zu ^{14}C -Geranylgeranylpyrophosphat um; das entstehende GGPP dient den Enzymen von *Neurospora* als Substratquelle für die in-vitro Synthese von Carotinoiden. Das Inkubationsmedium für den kombinierten Enzymansatz aus zellfreien Extrakten von *N. crassa* und dem Kürbisendosperm hatte folgende Zusammensetzung:

0,75 mg	Membranproteine oder
1- 4 mg	solubilisierete und in Lipidvesikeln inserierte Proteine (s. Abschnitt II.2.6.)
15-30 mg	Kürbisendosperm (35 KS-Überstand über Membranfilter YM 30 konzentriert, entspricht 0,4-0,8 ml)

Cofaktoren: 3,75 mM ATP; je 0,37 mM NADP, NAD, NADH;
1mM NADPH; 0,1 mM FAD; 18,8 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$;
1,3 mM $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$; 6,25 mM DTT;

13,3 mM KF als Phosphatasehemmstoff

1 μmol PEP und 100 μg Pyruvatkinase als ATP-regenerierendes System

0,5 ml 2 M Tris-HCl pH 7,8

Mit 50 mM Tris-Puffer (2 mM DTT, pH 7,8) wurde eine Endvolumen von 7,5 ml eingestellt.

ATP, NADP, NADPH, NAD, NADH, PEP, Pyruvat-Kinase wurden von Boehringer (Mannheim) bezogen, FAD von Sigma.

Die Inkubationsansätze (in 30 ml Corexgläsern) wurden 2-6,5 h lang bei 27°C im Wasserbad im Dunkeln inkubiert.

Je nach Wahl der nachfolgenden Extraktionsmethode (s.

Abschnitt II.2.8.) wurden die Enzymreaktionen entweder durch Zugabe von 5 ml Ethanol und 5 ml Aceton oder durch 10 ml

Chloroform : Methanol gestoppt.

2.7.2. ^{14}C -Phytoen als Substrat

2.7.2.1. Enzymatische Synthese von ^{14}C -Phytoen

Die Synthese von ^{14}C -Phytoen erfolgte in-vitro im kombinierten Enzymsatz bestehend aus den membrangebundenen carotinoid-synthetisierenden Enzymen von *N. crassa* und dem GGPP-bildenden System aus dem Kürbisendosperm (s. Abschnitt II.2.7.1.). Auf Grund der angebotenen Cofaktorenkonzentrationen konnte eine weitere Metabolisierung von ^{14}C -Phytoen zu den ungesättigteren Carotinoiden weitgehend unterbunden werden. Nach 6 h Inkubation bei 27°C im Dunkeln konnte eine ausreichende Akkumulation von Phytoen erreicht werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml Ethanol und Aceton gestoppt.

2.7.2.2. Aufreinigung der ^{14}C -Phytoenfraktion

Zur Gewinnung von ^{14}C -Phytoen wurden die Inkubationsansätze verseift (s. Abschnitt II.2.8.) und anschließend die radioaktiv markierten Syntheseprodukte nach der unter Abschnitt 2.8.1. beschriebenen Methode mit Aceton : Methanol (2:1 v/v) extrahiert.

Die nicht verseifbaren Lipide wurden anschließend auf ein geringes Volumen (ca. 2 ml) eingeeengt und über eine desaktivierte Aluminiumoxidsäule: Brockmann-Grad I-II (1% H_2O desaktiviert; wassergekühlte Chromatographiesäule : $\varnothing$ 18 mm, h: 85 mm entsprechend 13,6 g Aluminiumoxid 90 aktiv, neutral; Merck) aufgetrennt.

Für die Trennung der Syntheseprodukte (Sterine, Phytoen, Phytofluene, ungesättigtere Carotinoide und Kauren) wurde ein Entwicklergemisch bestehend aus Petroläther (Kp. 40-60°C) mit ansteigenden Konzentrationen (v/v) von Diethyläther verwendet (Mende, 1976; Mitzka-Schnabel, 1978): 50 ml reiner Petroläther, 50 ml 0,6 %, 100 ml 0,9 % (in 3 Fraktionen von 30-40 ml

gesammelt), 50 ml 1 %, 100 ml 100 % Diethyläther in Petroläther.

Die Komponenten, die bei den verschiedenen Ätherkonzentrationen eluiert wurden, konnten anschließend über Dünnschicht-Chromatographie in einem Petroläther : Toluol-System (92:4 v/v) wie in Abschnitt II.2.8.3. beschrieben weiter aufgetrennt und nachfolgend identifiziert werden. Durch 0 % und 0,6 % Diethyläther konnte Kauren völlig abgetrennt werden, die ersten 30 ml der 0,9 % Ätherfraktion enthielten den Hauptanteil an Phytoen. Um Kontaminationen von Phytofluon und ζ -Carotin in den 0,9 und 1 % Ätherfraktionen weitgehend auszuschließen, wurde als Substratquelle für ^{14}C -Phytoen-Inkubationen nur das erste 30 ml-Eluat der 0,9 % Ätherfraktion verwendet.

Diese nahezu reine Phytoenfraktion wurde eingeeengt, in Chloroform aufgenommen und bei -20°C unter N_2 aufbewahrt.

2.7.2.3. Enzymtest mit ^{14}C -Phytoen-Liposomen

Im Enzymtest wurde das lipophile Substrat ^{14}C -Phytoen in Form von Liposomen angeboten und die membrangebundenen bzw. solubilisierten Enzyme, die das angebotene Substrat zu den ungesättigteren Carotinoiden umsetzen, ebenfalls in diese Liposomen eingeschlossen.

Die Präparation der ^{14}C -Phytoen-Liposomen und die Insertion der Enzyme in diese Lipidvesikeln ist unter Abschnitt III.1.1.2. detailliert dargestellt.

Die Inkubationsansätze mit ^{14}C -Phytoen-Liposomen enthielten jeweils ^{14}C -Phytoen (535 000 cpm), das mit 6,6 mg N. crassa-Lipiden und 2,5 mg Membranprotein bzw. mit 8 mg Lipiden und 2,5 mg solubilisiertem Protein angeboten wurde. Diese Ansätze wurden für den Enzymtest mit 3,75 mM ATP, 0,02 mM FAD, 2 mM NADP, 10 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ und 2 mM DTT supplementiert. Nach Zugabe von 0,5 ml 2 mM Tris-Puffer (pH 7,8) wurden die Ansätze mit 50 mM Tris-Puffer (2mM DTT, pH 7,8) auf ein Endvolumen von 7,5 ml gebracht.

Nach 10-18 h Inkubation bei 27°C im Dunkeln unter gelegentlichem Schütteln wurden die Enzymreaktionen mit Chloroform : Methanol (2:1 v/v) gestoppt und ohne zu verseifen die lipophilen Syntheseprodukte nach der unter Abschnitt II.2.8.2.) beschriebenen Chloroform-Methanol-Methode extrahiert.

2.8. Extraktion und Bestimmung der Syntheseprodukte

Nach Beendigung der Enzymreaktion wurden die Inkubationsansätze mit ^{14}C -MVA vor der Extraktion verseift. Zur Verseifung wurden die wässrigen Aceton-Methanol-Extrakte bzw. Chloroform-Methanol-Extrakte (17,5 ml) mit 3,5 ml 40 %-iger (w/v) methanolischer KOH (Endkonz.: 6,7 %) versetzt und unter N_2 über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Bei Enzymsansätzen mit ^{14}C -Phytoen war eine Verseifung unnötig.

2.8.1. Aceton-Methanol-Extraktion

Zur Extraktion der lipophilen Substanzen wurden zum Extrakt 40 ml Aceton zugegeben und 5 min. lang bei ca. 500 x g zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde dreimal in Aceton : Methanol (2:1 v/v) resuspendiert und erneut jedesmal zentrifugiert.

Die gesammelten Überstände aus allen Zentrifugationsschritten wurden im Scheidetrichter vereinigt. Durch Zugabe von unmarkiertem Carrierfarbstoff aus *N. crassa* (5 µg pro Probe; Ext₄₇₇ = 2,5; dann entsprechen 0,5 ml 5 µg Pigment/Probe) sollte eine Zerstörung der radioaktiv markierten Carotinoide durch Sauerstoff und Licht auf ein Minimum reduziert und andererseits die chromatographische Identifizierung erleichtert werden. Die neutralen Lipide wurden nach Zugabe von 5 ml 0,5 M NaHCO_3 -Lösung und 5 %-iger Ammoniumsulfatlösung dreimal mit ca. 15 ml Petroläther (Kp. 40-60°C) extrahiert und die Petrolätherphasen abgetrennt.

Die gereinigten Petrolätherphasen wurden zweimal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen, über wasserfreiem NaSO_4 getrocknet, eingeeengt und in 10 ml Petroläther (Kp. 60-80°C) aufgenommen. Von einem Aliquot dieser lipophilen Fraktion wurde in Toluolcocktail die Radioaktivität bestimmt.

2.8.2. Chloroform-Methanol-Extraktion

Eine weitere Extraktionsmethode für die während des Enzymtests synthetisierten lipophilen Substanzen ist die sog. Chloroform-Methanol-Extraktion. Da sie bei vergleichbarer Extraktionsgüte sehr viel schneller und einfacher durchzuführen ist, wurde diese Methode gegenüber der oben genannten Aceton-Methanol-Extraktion bevorzugt durchgeführt.

Der (nicht) verseifte mit Chloroform/Methanol versetzte wässrige Extrakt (in 30 ml Corexglas) wurde zunächst bei $5\,000 \times g$ 5 min. lang zentrifugiert (Beckmann; Rotor JA 20); die Trennung zwischen wässriger und Chloroformphase wurde dadurch beschleunigt und gleichzeitig verbessert. Die untere, durch Lipide rötlich gefärbte Chloroformphase wurde gesammelt und die Extraktion noch weitere zweimal mit Chloroform : Methanol und zweimal mit reinem Chloroform durchgeführt. Nach den 5 Extraktionsschritten erschien die Interphasenschicht, die anfangs durch Lipide stark gefärbt war, farblos. Auf die Zugabe von unmarkiertem Carrierfarbstoff wurde in der Regel verzichtet, da die lipophile Fraktion ohnehin meistens stark gefärbt erschien und zudem durch die veränderten Extraktionsbedingungen der schädigende Einfluß von O_2 und Licht auf die radioaktiv markierten Carotinoide gegenüber der Aceton-Methanol-Methode drastisch verringert war.

Die gesammelten Chloroformphasen wurden eingeeengt, in 10 ml Petroläther (Kp. 40-60°C) aufgenommen und von einem Aliquot der Einbau von Radioaktivität in die lipophile Fraktion bestimmt.

2.8.3. Dünnschichtchromatographie

Die Auftrennung der lipophilen Fraktion erfolgte durch Chromatographie an Kieselgelplatten (DC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck). Als Laufmittel diente eine Lösung aus Toluol in Petroläther (Kp. 60-80°C) im Verhältnis 92:8 (v/v). Zweimaliges Abblasen der Platten mit N₂ (ungesättigte Kammer) führte zu einer Erhöhung der R_F-Werte und damit zu einer besseren Trennung. Die Entwicklungszeit lag bei ca. 100 min. Die entwickelten Platten wurden zunächst im sichtbaren Licht betrachtet und die ungesättigteren Carotinoide wie Neurosporaxanthin, 3,4-Dehydrolycopin, Lycopin, Neurosporin und γ -Carotin markiert. Im UV-Licht (254 nm) wurde auf Fluoreszenz geprüft und schließlich Phytoen durch Joddampf sichtbar gemacht. Die Identifizierung erfolgte durch authentische Vergleichssubstanzen. Das System lieferte eine befriedigende Auftrennung von Phytoen und den ungesättigteren Carotinoiden, sowie eine deutliche Abtrennung von Kauren, einem Kurbisprodukt (R_F-Wert von 0,85). Mit Toluol : Petroläther (8:92 v/v) werden etwa folgende R_F-Werte erwartet: 3,4-Dehydrolycopin (0,15); Lycopin (0,25); Neurosporin (0,30); γ -Carotin (0,40); ξ -Carotin (0,45); β -Carotin, Phytoen und Phytofluon (0,55-0,60); Squalen (0,75); Kauren (0,85); die Prenole bleiben am Start sitzen, ebenso Neurosporaxanthin eines der Endprodukte im Biosyntheseweg der Carotinoide von *N. crassa*.

2.8.4. Messung der Radioaktivität

Die Lokalisation der Radioaktivität auf den Platten erfolgte mit einem Dünnschichtscanner mit Autonomschreiber (Fa. Berthold und Friesseke). An Hand der Scannerdiagramme wurden die DC-Platten in Regionen unterteilt und direkt in Szintillationsgläsern abgeschabt. Die Radioaktivität der einzelnen Substanzen bzw. Substanzgemische wurde im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer bestimmt (Contron). Der

Szintillationscocktail für die wässrigen Medien setzte sich aus 1 l Dioxan, 100 g Naphtalin und 7 g Butyl-PBD zusammen (Zahlausbeute 88 %). Für organische Lösungsmittel wurde folgender Cocktail verwendet: 1 l Toluol und 7 g Butyl-PBD (Zahlausbeute 96 %). Eine Standardisierung erfolgte durch das Externe-Standard-Kanal-Verhältnis oder intern mit ^{14}C -Toluol.

3. Lichtinduzierte Änderungen von in-vitro und in-vivo translatierten Proteinen und ihre Korrelation mit der Carotinoidbiosynthese

3.1. Extraktion der Nukleinsäuren

Die Extraktion der Nukleinsäuren erfolgte nach der von Hall et al., 1978 beschriebenen sog. "SDS-Proteinase K Methode". Die eingefrorenen Myzelpads (3-5 g Frischgewicht) wurden in einer Reibschale mit flüssigem Stickstoff pulverisiert und nach Zugabe von 13 ml kochend heißem Extraktionspuffer (0,2 M Na-borat, pH 9,0; 1 % (w/v) SDS; 30 mM EGTA; 5 mM DTT) durch 2-minütiges kräftiges Reiben homogenisiert. Der Rohextrakt wurde durch autoklaviertes Miracloth (Calbiochem) gepreßt und anschließend jeder Ansatz mit 6,5 mg Proteinase K (Merck) bei 37°C 1 h lang im Wasserbad inkubiert. SDS, das bei den folgenden Fällungsschritten stört, wurde anschließend durch Zugabe von 1 ml 2 M KCl ausgefällt und abzentrifugiert (10 min, Beckmann; Rotor JA 20; 10 000 rpm, 30 ml-Corexglas). Der resultierende Überstand wurde weiter mit 0,25 Vol. 12 M LiCl versetzt und die RNA über Nacht bei -4°C ausgefällt. Unter diesen Bedingungen bleiben DNA und niedermolekulare t-RNA in Lösung, während die RNA präzipitiert. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und dreimal mit 2 M LiCl gewaschen (Zentrifugation wie oben beschrieben). Das Pellet wurde schließlich in 3 ml 20 % (w/v) K-Acetat, pH 5,5 resuspendiert und durch Zugabe von 2,5 Vol. Ethanol (p.A.) wurde die RNA erneut ausgefällt. Daraufhin erfolgte eine weitere Reinigung der RNA über eine Cellulose-Säule, wobei

hauptsächlich Polysaccharide entfernt werden sollen (Mozer, 1980). Der Niederschlag aus der Ethanol-fällung wurde abzentrifugiert (10000 rpm, 20 min.), das Pellet vakuumgetrocknet und anschließend in 4 ml sog. EB-Puffer ("elution buffer" nach Aviv und Leder, 1972: 10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 mM EDTA; 0,1 % (w/v) SDS) aufgenommen. Durch kurzes Erhitzen in einem kochenden Wasserbad und anschließendes sofortiges Abkühlen im Eisbad sollten Hybridbindungen der RNA gelöst werden. Die RNA-Lösung wurde dann durch Zugabe von 1 ml 2,5 M NaCl auf eine NaCl-Konzentration von 0,5 M gebracht und auf eine Cellulosesäule (Biorad Econo-Säule) aufgetragen. Diese Cellulosesäule, die mit 200 mg mikrokristalliner Cellulose (Sigmacell Typ 50, Sigma) gefüllt war, wurde mit folgenden Waschschritten vorbereitet: 20 ml H₂O (mit 0,05 % DEP), 20 ml NaOH, 30 ml EB-Puffer und 20 ml BB-Puffer ("binding buffer": EB-Puffer mit 0,5 M NaCl). Bei diesen erhöhten Salzkonzentrationen binden Polysaccharide an die Cellulose, während RNA eluiert wird. Der Probendurchlauf wurde ein zweites Mal über die Säule geschickt, anschließend mit 0,5 ml 3 M Na-Acetat und 13 ml Ethanol versetzt und so die gereinigte RNA erneut bei -20°C über Nacht ausgefällt.

3.2. Isolierung von Poly A⁺-RNA

Die Isolierung von Poly A⁺-haltiger RNA aus dem vorgereinigten Gesamt-RNA-Extrakt wurde mittels Affinitätschromatographie an einer Oligo-dT-Cellulose-Säule nach Aviv und Leder, 1972 durchgeführt.

Die in Ethanol gefällte RNA wurde abzentrifugiert (10 000 rpm, 10 min.), das Pellet vakuumgetrocknet und mit 4 ml EB-puffer resuspendiert. Durch 2-minütiges Erhitzen und anschließendes sofortiges Abkühlen wurde wieder eine Enthybridisierung der RNA erreicht, bevor die RNA-lösung durch Zugabe von 1 ml 2,5 M NaCl auf eine Konzentration von 0,5 M eingestellt wurde. Unmittelbar vor Gewinnung der Poly A⁺-RNA erfolgte von einem Aliquot die quantitative Bestimmung der Gesamt-RNA durch

Extinktionsmessung bei 260 nm (Beckmann Model 24 Spektral-photometer). Eine Extinktionseinheit entspricht dabei 40 µg RNA/ml bei 260 nm. Das Verhältnis $A_{240}:A_{260}$ diente als Maß für die Reinheit der RNA-Präparation (Sollwert 1,7).

Inzwischen wurden 200 mg Oligo-dT-Cellulose (Sigma) in eine kleine Säule (Biorad Econo-Säule) gefüllt und durch dieselben Waschschrirte wie unter Abschnitt II.3.1. vorbereitet. Um eine möglichst vollständige Adsorption der Poly A⁺-haltigen RNA an die Oligo-dT-Sequenz zu erreichen, wurde die in BB-Puffer gelöste RNA zweimal über die Säule gegeben; dazwischen wurde die Säule mit 20 ml 0,1 M NaOH, 30 ml EB- und 20 ml BB-Puffer regeneriert. Die Poly A⁺-beladene Oligo-dT-Cellulose wurde zunächst mit 10 ml BB-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundenes Material zu entfernen. Die Eluierung der Poly A⁺-haltigen RNA erfolgte mit 4 ml EB- Puffer (niedrige Salzkonzentration), wobei jeweils 1 ml-Frakrionen gesammelt wurden. Der Poly A⁺-RNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen wurde photometrisch bei 260 nm erfaßt und die Fraktionen mit den höchsten Konzentrationen vereinigt.

Während der gesamten Auftrennung wurde die Durchlaufgeschwindigkeit der Säule auf 1 Tropfen/2 sec. eingestellt. Die so gereinigte Poly A⁺-RNA wurde anschließend nach Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat und 2,5 Vol. Ethanol bei -20°C über Nacht ausgefällt.

3.3. In-vitro-Translation

Für die in-vitro Translation wurde ein Nuclease-behandeltes Kaninchenreticulozytenlysats von "New England Nuclear" (Dreieich) verwendet, das laut Hersteller nach einer modifizierten Methode nach Pelham und Jackson, 1976, gewonnen wurde.

Die ethanolgefällte m-RNA wurde nach Zentrifugation (10 000 rpm, 20 min.) einem weiteren Reinigungsschritt unterworfen. Die messenger-RNA wurde in Micro Test Tubes von Eppendorf überführt, abzentrifugiert (12 000 rpm, 25 min.,

Eppendorf Microfuge) und vakuumgetrocknet.

Für die Translation wurde die Poly A⁺-RNA in sterilem Wasser (Ampuwa, Fresenius) in einer Konzentration von 0,5 µg/µl aufgenommen.

Für die zellfreie Proteinsynthese wurde folgendes Translationsgemisch vorbereitet: 250 µCi (L-³⁵S)-Methionin (Amersham, Braunschweig), 100 µl Reticulozytenlysat, 20 µl 1 M K-Acetat, 5 µl 0,05 M Mg-Acetat, 55 µl "Translationscocktail" (Spermidin, Creatinphosphat, DTT, Guanosintriphosphat in HEPES-Puffer) und Wasser ad 230 µl.

23 µl dieses Translationsgemisch wurden mit 1 µg Poly A⁺-RNA 60 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Proteinsynthese wurde durch rasches Kühlen der Proben auf Eis gestoppt. Zur Überprüfung der Translationsaktivität des Reticulozytenlysats wurde stets ein Ansatz mit mitgelieferter aktiver Hefe-m-RNA durchgeführt bzw. die endogene Proteinsynthese des Kaninchen-Systems durch einen Ansatz ohne exogene m-RNA untersucht.

Der Einbau von ³⁵S-Methionin wurde durch folgende Schritte bestimmt: Je 1 µl des Translationsansatzes wurde auf mit 10 %iger (w/v) TCA vorbehandelte Filterpapier-Blättchen (Schleicher & Schüll, Nr. 565) aufgetragen, getrocknet und nach Mans und Novelli (1961) mehrmals in folgenden Lösungen gewaschen: 10 % kalte TCA, 10 min; 5 % kochende TCA, 10 min; 5 % kalte TCA, 5 min und 96 % Ethanol, 5 min.

Durch diese Waschschrte sollte freies ³⁵S-Methionin, sowie ³⁵S-Methionin-t-RNA entfernt werden, während die TCA-gefallten Proteine am Papier haften bleiben. Die eingebaute Radioaktivität wurde anschließend in 5 ml Toluol-Szintillationscocktail (0,7 % (w/v) Butyl-PBD) bestimmt. Der verbleibende Rest des Translationsansatzes wurde bis zur Auftrennung der in-vitro gebildeten Proteine bei -20° aufbewahrt.

3.4. Auftrennung der Translationsprodukte mittels Gelelektrophorese

Die Auftrennung der in-vitro Translationsprodukte erfolgte durch 2-dimensionale Kombination einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) und anschließender SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese (PAGE) nach O'Farrell (1975).

3.4.1. Isoelektrische Fokussierung

Die IEF wurde in vertikalen Rundgelen durchgeführt. Dazu wurden Glasröhrchen von 16 cm Länge und 3 mm Innendurchmesser an ihrem unteren Ende mit Parafilm verschlossen, bevor sie mit folgender Gellösung bis zu einer Höhe von 12,5 cm gefüllt wurden: 5,5 g Harnstoff, 1,33 ml 30 % Acrylamid (Acrylamid : Bisacrylamid 28,4:1,6), 2,0 ml 10 % (v/v) Nonidet P-40 (Sigma), 0,4 ml Servalyt pH 5-7 (Serva), 0,1 ml Servalyt pH 3-10 (Serva), auf 10 ml mit H₂O aufgefüllt. Die Acrylamidkonzentration entsprach somit 4 %, wobei der Vernetzeranteil (Bisacrylamidanteil) 5,6 % beträgt (T= 4 %; C= 5,6 %).

Der Harnstoff wurde in handwarmem Wasser gelöst und die Gellösung evakuiert, bevor 10 µl 10 % (w/v) APS und 7 µl TEMED als Polymerisationsstarter zugesetzt wurden. Die Gellösung in den Röhrchen wurde mit je 25 µl 8 M Harnstoff überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation (1-2 h bei Raumtemperatur) wurde die Harnstofflösung durch 25 µl Probenpuffer A* ersetzt und zusätzlich mit 10 µl H₂O überschichtet, um ein Auskristallisieren des Harnstoffs an der Oberfläche zu verhindern (Probenpuffer A*: 9,5 M Harnstoff, 2 % (v/v) Nonidet P-40, 5 % (v/v) EtSH, 0,2 % SDS, 1,6 % (v/v) Servalyt pH 5-7, 0,4 % (v/v) Servalyt pH 3-10).

Nach weiteren 1-2 h wurden die Überstände über den Gelen wieder abgesaugt, der Parafilm entfernt und die Röhrchen in eine Disk-Elektrophorese-Trennkammer DEA 90 (WTW) eingesetzt. Die untere, anodische Pufferkammer enthielt 2 l 0,01 M H₃PO₄ (pH 2,5), die obere, kathodische Kammer 1 l 0,02 M NaOH (evakuiert, pH 11,6).

Die Gelröhrchen wurden erneut mit 25 µl A*-Puffer beschickt, sodann mit Kathodenpuffer bis zum Rand gefüllt. Die Vorfokussierung der Gele erfolgte mit steigender Spannung: 15 min. bei 200 V, 30 min. bei 400 V und schließlich 30 min. bei 600 V (LKB 2197 Power Supply). Die verschiedenen amphoteren Polyelektrolyte der Servalyt-Lösungen wandern dabei im elektrischen Feld, bis ihre Nettoladung gleich Null ist. Aufgrund ihrer großen Pufferkapazität geben sie dem umgebenden Gel ihren pH-Wert und bauen so einen relativ stabilen pH-Gradienten auf, in dem sich bei Fokussierung die aufzutrennenden Proteine gemäß ihres isoelektrischen Punktes verteilen.

Nach erfolgter Vorfokussierung wurden die Überstände über den Gelen entfernt, die Translationsprodukte (Aliquot entsprechend 500 000 cpm in 40 µl A*-Puffer aufgenommen) auf die Rundgele aufgetragen und mit 10 µl "sample overlay" (9 M Harnstoff, 2 % Servalyt pH 5-7, 0,5 % Servalyt pH 3-10) überschichtet. Danach wurden sie über Nacht bei 600 V fokussiert, anschließend eine weitere Stunde bei 1000 V. Nach beendeter Fokussierung wurden die Gele mittels einer Wasserspritze unter Druck aus den Glasröhrchen herausgespült und zur Angleichung an die SDS-Konzentration der PAGE 30 min. lang unter Schwenken in 5 ml IEF-Probenpuffer (62,6 mM Tris-HCl; 2,3 % SDS; 7,5 % Glycerin; 5 mM DTT) äquilibriert.

Anschließend wurden die Rundgele entweder auf die PAGE aufgebracht oder bei -60°C aufbewahrt.

Zur Bestimmung des pH-Gradienten in den Rundgelen wurde ein ohne Probe fokussiertes Gel in 1 cm-Stücke geschnitten, die 4-5 h in 0,5 ml 0,02 M KCl in einem Exsikkator über 2 M NaOH (zur Entfernung des CO₂) eluiert wurden. Die pH-Messung erfolgte mit Hilfe einer pH-Mikroelektrode (Pusl).

3.4.2. Polyacrylamidgel-Elektrophorese (2. Dimension)

Für die Auftrennung in der 2. Dimension wurde eine Vertikal-Elektrophoresekammer (LKB 2001) benützt.

Zum Gießen von jeweils 2 Gelen wurden folgende Ansätze

zusammenpipettiert:

	Leichte Lösung	Schwere Lösung
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	6,75 ml	6,75 ml
50% Acrylamid (C= 2,7 %)	5,40 ml	8,80 ml
10 % SDS	0,27 ml	0,27 ml
dest. H ₂ O	14,53 ml	-
75 % (w/v) Glycerin	-	11,13 ml

Um eine langsame und gleichmäßige Polymerisation zu gewährleisten, wurden die Gellösungen vorgekühlt und dann jeweils 39 µl 10 % APS und 13 µl TEMED als Polymerisationskatalysatoren zugegeben. Mit Hilfe eines Zweikammer-Gradientenmischers wurden aus je 13,5 ml der beiden Gellösungen 1,5 mm dicke lineare Acrylamidgradientengele gegossen (Gelgröße 14 x 16 cm). Die Geloberfläche wurde zunächst mit 2 ml H₂O überschichtet, nach erfolgter Polymerisation (1-2 h) wurde das Wasser durch Puffer (375 mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,1 % (w/v) SDS) ersetzt (Einwirkzeit mindest. 1 h).

Auf das Trenngel wurde dann ein Sammelgel gegossen. Dazu wurde der Puffer wieder abgesaugt und die Geloberfläche mit Filterpapier sorgfältig trockengetupft, bevor die obere Pufferkammer auf die Gießkassette aufgesetzt und abgedichtet wurde.

Für je 2 Sammelgele (T= 4 %) wurden gemischt: 7,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,3 ml 10 % SDS; 19,7 ml 75 % (w/v) Glycerin; 2,5 ml 50 % Acrylamid (C= 2,5 %).

Nach Zusatz von 90 µl 10 % APS sowie 30 µl TEMED wurde die Lösung bis zum oberen Rand in die Gießkassette gefüllt und wieder mit 2 ml H₂O überschichtet. Die Polymerisation dauerte bei Raumtemperatur etwa 1 h. Anschließend wurde das Wasser wieder abgesaugt, die Rundgele der 1. Dimension auf die Sammelgeloberfläche aufgelegt und mit 1 %-igem Agarosegel (in IEF-Probenpuffer, mit etwas Bromthymolblau angefärbt) fixiert. Außerdem wurde am Rand des Gels mit Hilfe eines Plexiglas-Stückchens eine 7 mm breite Auftragemulde für die Markerproteine im erstarrenden Agarosegel geformt, in die 20 µl einer Proteinstandardslösung aufgetragen wurden (je 1 mg

Proteinmischung No.4 und 5 (Serva) in 320 µl IEF-Probenpuffer und 80 µl Glycerin).

Schließlich wurden die Gele in den mit 4 l Laufpuffer gefüllten unteren Puffertank eingehängt und auch die obere Pufferkammer mit Laufpuffer gefüllt (Laufpuffer: 25 mM Tris; 0,19 M Glycin; 0,1 % SDS). Die Elektrophorese verlief über 16 h bei 20 mA für je 2 Gele (Netzgerät LKB) bei Wasserkühlung (15°C). Die Auftrennung wurde beendet, wenn die an der Front laufende Bromthymolblaubande (Agarosegel!) am unteren Ende aus dem Acrylamidgel austrat. Die leichtesten Proteine wanderten stets 2-3 cm hinter dieser Frontbande. Nach beendeter Auftrennung wurden die Gele vorsichtig von den Glasplatten gelöst und nach Entfernung des Sammelgels mit Coomassie angefärbt (Färbelösung: 0,5 % Coomassie Brilliant Blue R 250 in 95 % Ethanol, 1:1 gemischt mit 10 % Essigsäure).

Die Gele blieben mindestens 4 Stunden lang unter ständigem Schwenken in der Farblösung, bevor sie in 3 Schritten entfärbt wurden:

- I: 95 % Ethanol : 5 % Essigsäure 2:3; 2 h
- II. 95 % Ethanol : 5 % Essigsäure 4:1; 2 h
- III. 5 % Essigsäure : Wasser 7:3; über Nacht

3.4.3. Fluorographie (Bonner und Laskey, 1974)

Zur Einlagerung von PPO als Szintillator in die Gele wurden diese durch 2 x 30 min. Schwenken in DMSO (Dimethylsulfoxid) entwässert, daraufhin 4 h in 22 % (w/v) PPO (2,5-Diphenyloxazol) in DMSO inkubiert. Um das wasserunlösliche PPO im Gel auszufällen wurden die Gele 3 x 15 min gewässert.

Mittels eines Geltrockners wurden die Gele auf Filterpapier (Whatman Chromatographiepapier 0,38-9) aufgetrocknet. Die nur Coomassie-gefärbten Markerproteine wurden mit Spuren von ³⁵S-Methionin enthaltender Tinte markiert.

Zuletzt wurden die Gele auf Röntgenfilme aufgelegt und 3-4 Wochen bei -60°C im Dunkeln exponiert. (Entwickler: Kodak HC-110, 1:31 verdünnt, 5 min.).

3.5. Gewinnung der ^{35}S -markierten Membranproteine

Die eingefrorenen Myzelpads (s. Abschnitt III.2.2.) wurden in Plastikzentrifugenbecher mit 10 ml Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl (Serva); 200 mM Nicotinsäureamid (Serva); 2 mM DTT (Röth); pH 7,8) in Eiswasser aufgetaut und 8 min lang mit Ultraschall behandelt (Sonifierstab Branson B 12, Mikrospritze, output Stufe 6-7, 50-60 W).

Dieses Rohhomogenat wurde durch differentielle Zentrifugation (Abb. 2) weiter fraktioniert (s. Abschnitt II.2.2.). Die so gewonnenen 115 KP-Membranpellets wurden vorsichtig mit dem Spatel in Micro Test Tubes überführt und in 0,3 ml Tris-HCl-Puffer (50 mM Tris, 2mM DTT, pH 7,8) durch Sonifizieren resuspendiert. Von einem Aliquot (3-5 μl) wurde in Toluol-PBD-Cocktail die Radioaktivität bestimmt.

3.6. Auftrennung der Membranproteine durch Gelelektrophorese Probenvorbereitung und Solubilisierung

Bevor die Membranproteine nach der von O'Farrell (1975) beschriebenen Methode elektrophoretisch aufgetrennt werden konnten, war eine Vorreinigung und Solubilisierung der Proteinproben nötig.

Um Nukleinsäuren als mögliche Störfaktoren bei der Elektrophorese auszuschließen wurden die Proteinproben (2-4 mg Protein in 0,2 ml Tris-Puffer) mit 20-50 μl Nukleaselösung 30 min. lang bei Raumtemperatur inkubiert (RNase-Lösung: 1 mg RNase; 990 μl H_2O ; 10 μl 2 M Tris-HCl, pH 7,8 und 10 μl 10% (w/v) MgCl_2).

Eine weitere Probenaufreinigung konnte durch mehrmaliges Umfällen mit Aceton erreicht werden, wobei störende Komponenten wie Lipide und Pigmente entfernt wurden. Die Proteinelösung wurde dazu langsam mit 3 Vol. eiskaltem Aceton (75 % (v/v) Aceton, 0,01 M EtSH) versetzt und 1 h bei -20°C gehalten. Der Proteinniederschlag wurde 15 min. bei $10\,000 \times g_{av}$ bei 4°C abzentrifugiert (Eppendorf Microfuge oder Beckmann) und das Pellet noch zweimal mit 70%-igem Aceton (0,01 M EtSH) ge-

waschen. Um restliches Aceton zu entfernen wurde der resultierende Niederschlag vakuumgetrocknet (1 h) und anschließend in Lysis-Puffer A* nach O'Farrell, 1975 aufgenommen [400 µg Protein/25 µl A*] (Zusammensetzung des A*-Puffers s. Abschnitt II.3.4.1.).

Um den lyophilisierten Niederschlag vollständig zu resuspendieren wurden die Proben mit Ultraschall behandelt und 45 min. lang bei 20°C inkubiert. Durch die Ultraschallbehandlung wie auch durch die im Lysispuffer enthaltenen Detergenzien NP-40 und SDS und das chaotrope Reagens Harnstoff konnte eine effektive Solubilisierung und Disaggregation der Membranproteine erreicht werden (O'Farrell, 1976; Boschetti et al., 1978).

Die Proteinbestimmung erfolgte nach dem Biorad Protein-Assay (Bradford, 1976; Biorad Laboratories, 1981). Als Proteinstandard diente eine Lösung aus Ovalbumin.

III. ERGEBNISSE

1. Charakterisierung der carotinoidsynthetisierenden Enzyme

1.1. Untersuchung der membrangebundenen Enzymaktivitäten

1.1.1. Carotinoidbiosynthese im kombinierten Testsystem mit ^{14}C -MVA

GGPP ist das direkte Substrat für die carotinoid-synthetisierenden Enzyme. Da reines ^{14}C -GGPP nicht käuflich und biochemisch nur schwer zu synthetisieren ist und zudem synthetisches ^{14}C -GGPP nur zu einem sehr geringen Anteil durch Neurospora-Enzyme metabolisiert wird (Mitzka-Schnabel, 1978; Eiberger, 1983), wurde im in-vitro Test ^{14}C -MVA als Ausgangssubstrat angeboten.

Das Neurospora eigene, lösliche GGPP-bildende System kann angebotenes ^{14}C -MVA nur relativ schlecht zu GGPP umsetzen. Um diese Substratlimitierung (Mitzka-Schnabel, 1978) zu umgehen, wurde ein GGPP-lieferndes System aus dem Endosperm von Cucurbita pepo eingesetzt. Dieses Enzymsystem katalysiert die Bildung von GGPP und Kauren, nicht aber die von Carotinoiden. Während einer 2,5-stündigen Vorinkubationsphase wird in ausreichendem Maße GGPP aus MVA synthetisiert (Mende, 1976; Mitzka-Schnabel, 1978) und steht als Substrat für die Carotinoidbiosynthese von Neurospora zur Verfügung (Mitzka-Schnabel, 1978).

Bei einem derartigen kombinierten Enzymsatz ergibt sich jedoch eine Konkurrenz um das synthetisierte GGPP; GGPP wird dabei hauptsächlich vom Kürbisendosperm in Kauren umgesetzt, während ein nur relativ geringer Anteil in die Carotinoidbiosynthese eingeht.

Versuche, die GGPP-Metabolisierung zu Kauren durch Zusatz von AMO 1618 ($2,8 \times 10^{-5} \text{ M}$), einem Cyclaseinhibitor (Dennis et

al., 1965), weitgehend zu unterbinden, waren zwar erfolgreich, führten jedoch zu einer drastischen Reduktion des ^{14}C -Einbaus in die nicht verseifbare lipophile Fraktion, in Phytoen und in die ungesättigteren Carotinoide (Mitzka-Schnabel, 1978). Es sollte deshalb untersucht werden, ob eine gleichzeitig beginnende Inkubation beider Enzymsysteme zu einer Steigerung der Carotinoidsyntheseleistung führt.

Nach Lichtinduktion der carotinoidsynthetisierenden Enzyme im Myzel (Abschnitt II.2.1.) wurde die membrangebundene Enzymfraktion gewonnen (s. Abschnitt II.2.2.). Im kombinierten Enzymtest (s. Abschnitt II.2.7.1.) mit ^{14}C -MVA wurden 30 mg Kürbisendosperm als GGPP-lieferndes System nach einer 2,5-stündigen Vorinkubationszeit oder sofort mit Membranen (0,75 mg Protein) von *Neurospora* inkubiert (10 min - 1 h - 6 h). Mit dieser eingesetzten Proteinmenge konnte eine gute in-vitro Syntheseleistung der *Neurospora*-Enzyme erwartet werden (Stark, 1982).

Die Ergebnisse, die in Tab. 1 zusammengestellt sind, zeigen, daß bei einer von Anfang an gleichzeitigen Inkubation beider Enzymsysteme das gemeinsame Substrat GGPP nun überwiegend in den Carotinoidbiosyntheseweg eingeschleußt wird, während die Kaurenbildung deutlich vermindert wird. Etwa 71 % der eingebauten Radioaktivität liegen im Phytoen vor, während die nachfolgenden Reaktionsschritte deutlich geringere Enzymaktivitäten aufweisen.

Tab. 2 zeigt den zeitlichen Verlauf des ^{14}C -MVA-Einbaus in die nicht verseifbare lipophile Fraktion, in Phytoen und in die ungesättigteren Carotinoide im kombinierten Enzymtest bei gleichzeitig beginnender Inkubation der *Neurospora*-Enzyme mit dem GGPP-liefernden Kürbissystem. Der spezifische Einbau in Phytoen und in die ungesättigteren Carotinoide ist zusätzlich als Funktion der Zeit in Abb. 3 dargestellt.

Wie die Ergebnisse zeigen, erfolgt der ^{14}C -Einbau in Phytoen und in die ungesättigteren Carotinoide bis zu einer Inkubationszeit von 2 Stunden nahezu linear. Dabei wurden 950 pmol MVA pro mg Protein und pro min. ins Phytoen umgesetzt bzw. 70 pmol pro mg und pro min in die ungesättigteren Carotinoide.

Tabelle 1:

Einbau von Radioaktivität (% vom Gesamteinbau und cpm) in verschiedene Syntheseprodukte bei verschiedenen Inkubationsbedingungen. (Mittelwerte aus 3 Versuchen).
 Enzymtest: Membranen (0,75 mg Protein) und 30 mg Kürbisendosperm.
 Ungesättigte Carotinoide (unges. Carot.): Neurosporin, Lycopin, 3,4-Dehydrolycopin;
 γ-Carotin. Nsp.x.= Neurosporaxanthin; n.ident. Prod.= nicht identifizierte Produkte;
 n.v.l.Frkt.= nicht verseifbare lipophile Fraktion.

Bedingungen		Einbau von Radioaktivität in					
		n.v.l.Frkt. (cpm)	Phytoen (%) (cpm)	unges. Carot. (%) (cpm)	Nsp.x.+ n.ident. Prod. (%) (cpm)	Kauren (%) (cpm)	
2,5 h	Enzym- kubation test						
	10 min. 1 h	1 115 920 1 295 860	18,7 277 930 20,4 351 790	1,8 26 190 0,9 15 550	5,8 65 060 6,2 80 210	73,7 822 660 72,5 939 890	
0 h	10 min	56 080	75,3 42 210	4,2 2 380	18,3 13 630	2,2 1 640	
	1 h	597 260	70,3 563 330	4,1 32 650	19,0 113 660	6,1 36 610	
	6 h	1 879 210	53,7 1346 770	7,4 186 170	16,4 307 810	22,4 421 880	

Tabelle 2:

Einbau von Radioaktivität in die nicht verseifbare lipophile Fraktion (n.v.l.Frkt.) in cpm, in Phytoen und in die ungesättigteren Carotinoide (% vom Gesamteinbau und cpm/mg Protein) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. (Mittelwerte aus 3 Versuchen).

Inkub.- zeit (min)	Einbau von Radioaktivität in:				
	n.v.l.Frkt.	Phytoen		unges. Carot.	
	(cpm)	(%) (cpm/mg Prot.)	(%) (cpm/mg Prot.)	(%) (cpm/mg Prot.)	(%) (cpm/mg Prot.)
10	56 080	75,3	56 280	4,2	3 170
30	379 610	78,2	296 700	4,5	23 010
60	591 480	70,7	557 570	4,1	32 230
120	1 138 530	68,9	1 045 780	7,2	109 310
180	1 296 680	68,8	1 089 760	6,2	107 160
240	1 528 580	53,8	1 097 370	5,9	120 210
360	1 879 210	53,9	1 350 500	7,5	186 680
480	1 820 320	58,8	1 431 740	7,6	183 240
600	1 800 000	53,8	1 292 400	7,7	184 800
1200	1 651 380	48,9	1 076 260	9,0	198 170

Längere Inkubationszeiten führten zwar zu einer stärkeren ^{14}C -Markierung von Phytoen und von den ungesättigteren Carotinoiden, die spezifische Aktivität (pmol/mg $\times$ min) der carotinoidsynthetisierenden Enzyme nimmt jedoch ab; ebenso sinkt der prozentuale Anteil der insgesamt in die Carotinoide eingebauten Radioaktivität. Das synthetisierte GGPP wird dann zu einem großen Teil ins Kauren umgesetzt.

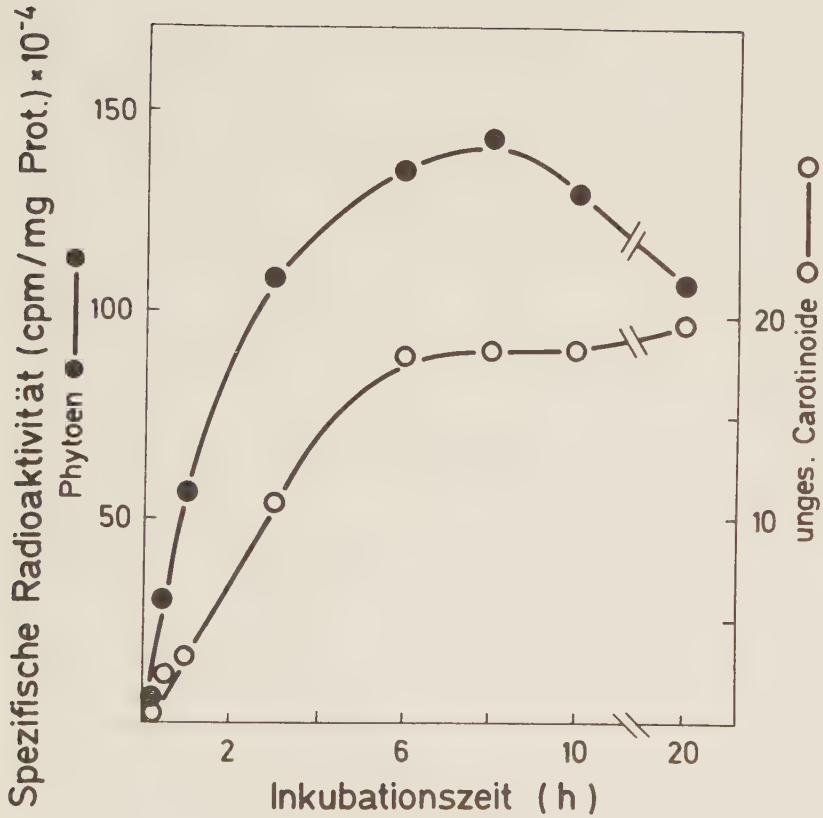


Abb. 3:

Zeitlicher Verlauf des spezifischen ^{14}C -Einbaus in Phytoen und in die ungesättigteren Carotinoide im kombinierten Enzymtest. Es wurden jeweils 0,75 mg membrangebundenes Protein eingesetzt. (Mittelwerte aus 3 Versuchen).

1.1.2. Bestimmung von Enzymaktivitäten mit ^{14}C -Phytoen

Bei *Neurospora* war bislang eine Untersuchung der Enzyme, die Phytoen in die ungesättigteren Carotinoide umsetzen, wenig erfolgreich. Wie die Ergebnisse in Tab. 1 und 2 zeigen, kann im kombinierten Enzymtest in Gegenwart eines GGPP-liefernden Systems aus dem Kürbisendosperm und den membrangebundenen carotinoidsynthetisierenden Enzymen stets nur eine unbefriedigende ^{14}C -Markierung der ungesättigteren Carotinoide erreicht werden, obgleich ^{14}C -Phytoen stark akkumuliert wird. Als Ursache für die geringe Umsetzung von Phytoen in die Folgeprodukte wurde vermutet, daß die Bedingungen im kombinierten Enzymtest zwar hinsichtlich GGPP- und Phytoensynthese optimiert waren (Mitzka-Schnabel, 1978; Stark, 1982; Eiberger, 1983), jedoch für die vom Phytoen ausgehenden enzymatischen Reaktionen recht ungeeignet waren.

Deshalb sollte versucht werden, ^{14}C -Phytoen als direktes Substrat im Enzymtest einzusetzen, um die in-vitro Synthese der ungesättigteren Carotinoide von der GGPP- und Phytoenbildung zu entkoppeln und um somit die Möglichkeit zu schaffen, speziell für diese Enzyme, die möglicherweise eine Isomerase, Dehydrogenase(n), Cyclase(n) und eine Oxidase darstellen, optimale Testbedingungen zu erarbeiten.

In Vorversuchen konnte trotz geringer ^{14}C -Phytoenumsetzungen gezeigt werden, daß die Weitermetabolisierung des angebotenen wasserunlöslichen Substrates durch die membrangebundenen Enzyme bevorzugt in lipophiler Umgebung, in sog. Liposomen erfolgt, während ^{14}C -Phytoen, das in Ethanol oder Methanol gelöst war oder das nur durch Sonifizieren dispergiert wurde, deutlich schlechter umgesetzt werden konnte.

Für die Präparation der ^{14}C -Phytoen-Liposomen wurde folgende Technik ausgearbeitet: In-vitro synthetisiertes und aufgereinigtes ^{14}C -Phytoen [535 000 cpm] (s. Abschnitt II.2.7.2.1. und 2.7.2.2.) wurde gemeinsam mit 6,6 mg Membranlipiden (Extraktion s. Abschnitt II.2.5.1.) in ein Reagenzglas pipettiert und das Lösungsmittel Chloroform unter einem leichten N_2 -Strom entfernt. Der so entstandene Lipid-Phytoen-

Film, der sich an der Glaswand absetzte, wurde anschließend 45 min. lang vakuumgetrocknet um Spuren des Lösungsmittels zu entfernen. Nach einer 1-stündigen Quellung in 0,75 ml Puffer (50 mM Tris-HCl, 2 mM DTT, pH 7,8) bei 4°C im Dunkeln wurde der Lipid-Phytoen-Film durch 3-4 Sonifierpulse (5 sec.) dispergiert. Die so entstandenen Liposomen wurden mit 2,5 mg membrangebundenem Protein (in 0,75 ml Puffer) gemischt. Durch etwas längere Ultraschallbehandlung von maximal 2 min. sollten die membrangebundenen Enzyme in sehr engen Kontakt mit den Phytoen-Liposomen gebracht werden.

1.1.2.1. Cofaktorenbedarf

Um die in-vitro Syntheseaktivität der Dehydrogenase(n), Isomerase(n), Cyclase(n) und Oxidase ausgehend von Phytoen zu optimieren, wurde die Wirkung von verschiedenen Cofaktoren auf die Umsetzung von ^{14}C -Phytoen untersucht.

Zum Cofaktorenrequirement der oben genannten Enzyme liegen bereits einige Angaben vor. Danach sollten für die Metabolisierung von Phytoen im wesentlichen Mg^{2+} , Mn^{2+} , FAD, NADP und unter Umständen noch ATP nötig sein oder zumindest steigernd wirken (Qureshi et al., 1974; Kushwaha et al., 1976; Maudinas et al., 1977; Beyer, 1986; El-Jack et al., 1987). Bei den einzelnen Dehydrierungsschritten spielt möglicherweise auch Sauerstoff als Elektronenakzeptor eine Rolle (De La Concha et al., 1983; Beyer, 1987).

Im Vergleich zum Cofaktorenangebot im kombinierten Testsystem mit ^{14}C -MVA als Ausgangssubstrat sollte nun mit ^{14}C -Phytoen als Substrat auf das ATP-regenerierende System verzichtet werden, ebenso auf KF, NAD, NADH, NADPH. NADP sollte dagegen in einer deutlich höheren Konzentration (2 mM) angeboten werden.

Die Variationen in der Cofaktorenzusammensetzung in den verschiedenen Inkubationsansätzen sind in Tab. 3 dargestellt. Als Enzymquelle wurden 2,5 mg Membranprotein eingesetzt, das vorher mit den ^{14}C -Phytoen-Liposomen (535 000 cpm ^{14}C -Phytoen

und 6,6 mg Membranlipide; Liposomenpräparation s. Abschnitt III.1.1.2.) durch Sonifizierbehandlung in Kontakt gebracht wurde. Die Durchführung des Enzymtests mit den ^{14}C -Phytoen-Liposomen, sowie die Chloroform-Methanol-Extraktion der in-vitro Syntheseprodukte nach der 16-stündigen Inkubation sind in Abschnitt II.2.7.2.3. und II.2.8.1. beschrieben.

Tab. 3 zeigt den Einfluß von verschiedenen Cofaktorenbedingungen auf die Umsetzung des angebotenen ^{14}C -Phytoens in die vier ungesättigteren Carotinoide, die nach Dünnschichtchromatographie (s. Abschnitt II.2.8.3.) eindeutig zu identifizieren waren. Bei dieser Dünnschichtauftrennung bleibt Neurosporaxanthin, ein Endprodukt im Carotinoidbiosyntheseweg von Neurospora, gemeinsam mit anderen radioaktiv markierten Substanzen am Auftragsort sitzen. Deshalb ist der Anteil an synthetisiertem Neurosporaxanthin nicht in den Meßwerten der ungesättigteren Carotinoide enthalten.

Wie die Ergebnisse in Tab. 3 und Abb. 4 zeigen, bestätigte sich die Vermutung, daß die Cofaktorenkombination wie sie im kombinierten in-vitro Test vorliegt für eine Phytoen-metabolisierung relativ ungünstig ist. Nur etwa 5 % der Radioaktivität kann in den ungesättigteren Carotinoiden wiedergefunden werden. Unter den veränderten Cofaktorenbedingungen (3,75 mM ATP; 2 mM NADP; 0,02 mM FAD; 10 mM MgCl_2 ; 1 mM MnCl_2) ist es dagegen möglich bis zu 43 % des angebotenen ^{14}C -Phytoens unter Aktivierung der membrangebundenen Dehydrogenase(n), Isomerase(n) und Cyclase(n) in die ungesättigteren Carotinoide umzusetzen. Besonders hervorzuheben ist dabei, daß das angebotene Substrat den gesamten Biosyntheseweg bis zu den acyclischen Endprodukten Lycopin und 3,4-Dehydrolycopin bzw. bis zum cyclischen γ -Carotin durchläuft.

Variationen innerhalb des oben genannten Cofaktorenangebotes lassen erkennen, daß durch ATP (3,75 mM) und FAD (0,1 oder 0,02 mM) die Synthese der ungesättigteren Carotinoide eindeutig stimuliert werden kann. Dagegen zeigt sich keine signifikante Steigerung der Phytoenumsetzung durch höhere

Tabelle 3:

^{14}C -Phytoenumsetzung (535 000 cpm) dargestellt in % in Abhängigkeit vom Cofaktorenangebot. (Mittelwerte aus 3 Versuchen).
 Kombination I: Cofaktoren wie im kombinierten Enzymtest;
 Kombination II: 3,75 mM ATP; 2 mM NADP; 0,02 mM FAD; 10 mM MgCl_2 ; 1 mM MnCl_2 .
 Lipide: 6,6 mg; Enzymtest: 2,5 mg membrangebundenes Protein; 16 h.
 Unges. Carot.= ungesättigte Carotinoide; Neurosp.= Neurosporin; γ -Car.= γ -Carotin;
 3,4-D.= 3,4-Dehydrolycopin; Nsp.x.= Neurosporaxanthin; n.ident. Prod.= nicht identifizierte Produkte.

Cofaktoren im Enzymtest	Phytoen	Einbau von Radioaktivität (%) in:				Nsp.x.+ n.ident. Prod.	
		unges. Carot. gesamt	einzelne unges. Carotinoide				
			Neurosp.	γ -Car.	Lycopin	3,4-D.	
Kombination I	88,8	5,3	1,7	2,7	0,5	0,6	5,8
Kombination II	37,8	42,7	6,1	5,9	9,0	21,7	19,3
variiert:							
ohne ATP	73,1	14,0	3,5	4,1	2,3	4,1	6,4
ohne FAD	68,9	19,5	4,1	5,3	3,5	6,6	11,2
0,1 mM	37,4	38,3	6,3	5,4	8,3	19,3	23,0
1 mM NADP	39,4	39,8	5,6	5,1	8,0	21,3	20,5
5 mM MgCl_2	40,5	41,4	5,7	4,9	6,7	24,1	17,9
20 mM	42,9	38,9	5,8	5,4	8,4	19,3	17,8

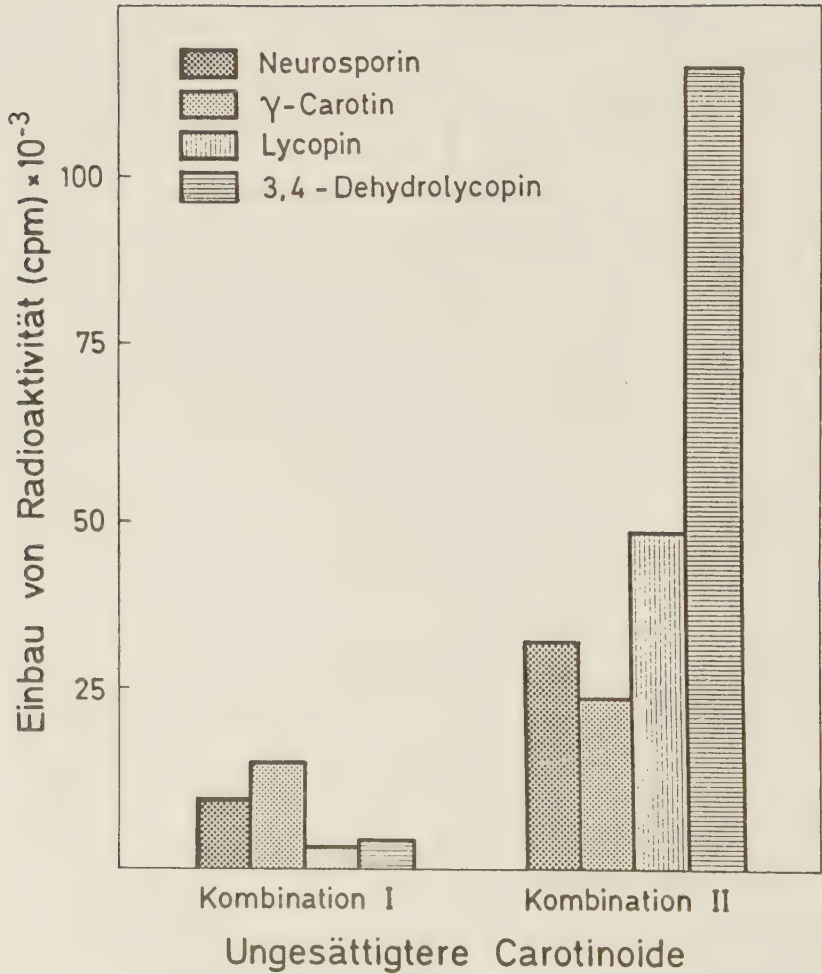


Abb. 4.

Einbau von Radioaktivität in die ungesättigteren Carotinoide ausgehend von ^{14}C -Phytoen (535 000 cpm) in Abhängigkeit vom Cofaktorenangebot. (Mittelwerte aus 3 Versuchen).
Kombination I: Cofaktorenbedingungen wie im kombinierten Enzymtest;
Kombination II: Verändertes Cofaktorenangebot.
Lipide: 6,6 mg; Enzymtest: 2,5 mg Membranprotein; 16 h.

Konzentrationen von FAD (0,1 und 0,02 mM), NADP (1 und 2 mM) und $MgCl_2$ (5, 10 und 20 mM).

1.1.2.2. Lipidabhängigkeit

Weiter sollte untersucht werden, in wie weit die Umsetzung des angebotenen Substrates ^{14}C -Phytoen durch die membrangebundenen Enzyme von der angebotenen Lipidmenge abhängt.

Die aus Vorversuchen gewonnenen Hinweise über die Effektivität der Phytoenmetabolisierung in Abhängigkeit von endogenen oder exogenen Lipiden sollten im Rahmen dieser Versuche unter optimierten Cofaktorenbedingungen konkretisiert werden.

Für diese Untersuchungen wurden 2,5 mg Membranfraktion als Enzymquelle eingesetzt. Das lipophile Substrat Phytoen wurde bei der Probe ohne exogene Lipidzugabe durch Sonifizieren in Puffer (50 mM Tris-HCl; 2 mM DTT; pH 7,8) dispergiert. In allen anderen Proben wurde das Substrat in lipophiler Umgebung den Enzymen als Phytoen-Liposomen angeboten. Die Präparation der Liposomen erfolgte wie unter Abschnitt III.1.1.2.

beschrieben. Variiert wurde lediglich die Menge an exogen zugegebenen Membranlipiden. Die membrangebundenen Enzyme (2,5 mg in 1,2 ml Puffer) wurden dabei mit dem Phytoen bzw. mit den Phytoen-Liposomen (535 000 cpm ^{14}C -Phytoen und 0-20 mg $\hat{=}$ 0-3,5 mmol/l Phospholipide) gemischt und durch längere Ultraschallbehandlung (1-2 min) in Kontakt gebracht.

Für den in-vitro Test (s. Abschnitt II.2.7.2.3.) wurden die einzelnen Inkubationsansätze mit folgenden Cofaktoren supplementiert: ATP (3,75 mM); NADP (2 mM); FAD (0,02 mM); $MgCl_2$ (10 mM); $MnCl_2$ (1 mM). Während der 16-stündigen Inkubation wurden die Ansätze mehrmals geschüttelt, um ein Sedimentieren von lipophilen Komponenten zu verhindern. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 dargestellt. Ein Vergleich der ^{14}C -Phytoenumsetzungsrate in den verschiedenen Ansätzen zeigt deutlich, daß die Synthese der ungesättigten Carotinoide um das 1,5-fache gesteigert werden kann, wenn das Substrat in Form von Liposomen angeboten wird. Der steigernde Effekt auf

die Phytoenmetabolisierung ist bei einer Konzentration von etwa 1 mmol/l Phospholipide am ausgeprägtesten. Höhere Membranlipidmengen dagegen wirken sich negativ auf die in-vitro Synthese der ungesättigten Carotinoide aus.

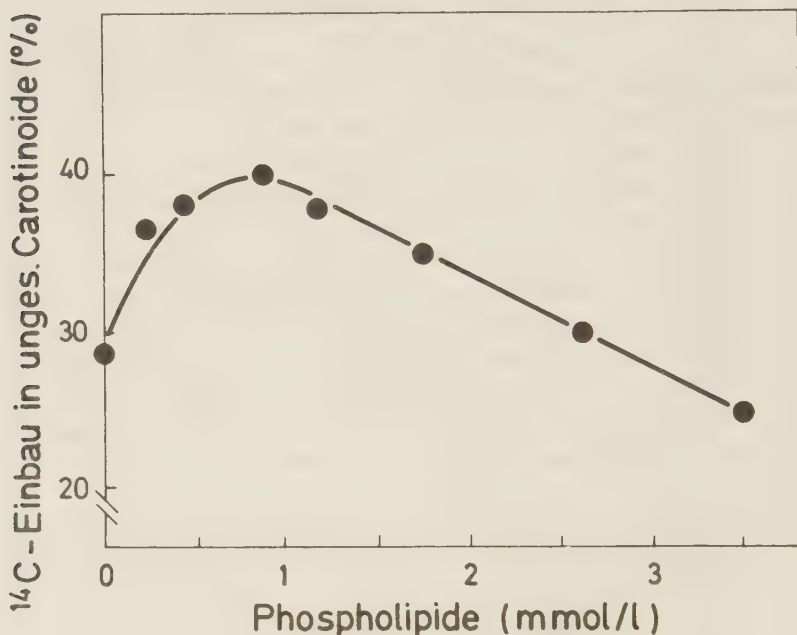


Abb. 5:

Umsetzung von ^{14}C -Phytoen in die ungesättigten Carotinoide (%) in Abhängigkeit von verschiedenen, exogen zugegebenen Lipidmengen. (Mittelwerte aus 3 Versuchen). ^{14}C -Phytoen (535 000 cpm) wurde zusammen mit exogenen Membranlipiden (0-20 mg $\hat{=}$ 0-3,5 mmol/l Phospholipide) als Liposomen angeboten. Enzymtest: 2,5 mg membrangebundenes Protein; 16 h.

In Abhängigkeit von der exogen zugegebenen Lipidmenge ändert sich das Spektrum der in-vitro synthetisierten ungesättigten Carotinoide kaum; dabei stellen die acyclischen Carotinoide Lycopin und 3,4-Dehydrolycopin die Hauptkomponenten dar. Unter optimalen Lipidbedingungen (1 mmol/l) beträgt ihr Anteil an

den gebildeten ungesättigteren Carotinoiden 74 %. Da die in-vitro Syntheseprodukte über Dünnschicht-chromatographie aufgetrennt wurden, wurden die Menge an synthetisiertem Neurosporaxanthin, Phytofluon, ζ - und β -Carotin nicht erfaßt.

1.2. Solubilisierung der carotinoidsynthetisierenden Enzyme und ihre Charakterisierung

1.2.1. Versuche zur Solubilisierung der Phytoensynthase mit hohen Salzkonzentrationen

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, sind die Enzyme der Carotinoidbiosynthese membrangebunden (Mitzka-Schnabel und Rau, 1981). Um detailliertere Aussagen über diese Enzyme machen zu können, ist ihre Solubilisierung nötig.

Wenn man die Vorstellung über die Kompartimentierung des Carotinoidbiosyntheseweges bei anderen Organismen zugrunde legt und berücksichtigt, daß bei Neurospora die Prenyltransferasen lösliche Enzyme sind und daß das Substrat GGPP hydrophil ist, so sollte die Phytoensynthase als peripheres Membranprotein einzuordnen sein. Periphere Membranproteine weisen in der Regel relativ schwache Assoziationen mit der Membran auf und sollten deswegen durch "high salt"-Behandlungen bzw. durch chaotrope Agentien von der Membran gelöst werden können (Helenius and Simons, 1975; Freedman, 1981; Van Renswoude, 1984).

Für die Solubilisierung der Phytoensynthase wurde demzufolge die Membranfraktion mit hohen Salzkonzentrationen (0,5-1-2 M KCl p.A., Merck) inkubiert. Die Solubilisierung der Membranproteine ist in Abschnitt II.2.3. beschrieben, statt CHAPS wurde KCl als solubilisierendes Agens eingesetzt. Nach der Zentrifugation wurden die farblosen bis schwach gefärbten Überstände, die die solubilisierten Proteine enthielten ("0,5-1-2 M KCl-Solubilisat"), ebenso wie die in Tris-Puffer resuspendierten Pellets auf ihre Phytoensynthaseaktivität hin

untersucht. Es wurden jeweils 1,0 mg der Enzymlösungen eingesetzt.

Durch "high salt"-Behandlungen der Membranen sollten nur die schwachen elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den peripheren Membranproteinen und der Membran gelöst werden, ohne daß die Integrität der Lipidmatrix zerstört wird. Einige membrangebundene Enzyme wie z.B. die Na^+K^+ -ATPase und Diacylglycerol Kinase (Sandermann, 1982; Lit. s. Russ et al., 1988), ja selbst der lösliche Phytoensynthasekomplex von *Narcissus* (Kreuz et al., 1982; Beyer, 1988) können ihre katalytische Funktion nur in Gegenwart von Lipiden voll erfüllen bzw. werden in ihrer Aktivität durch Lipide deutlich gesteigert. Daher wurden die solubilisierten Enzyme vor dem in-vitro Test durch Zugabe von 4 mg Membranlipiden reaktiviert. Die Technik für diese Reaktivierung bzw. Rekonstitution der Proteine ist in Abschnitt II.2.6. beschrieben.

Als Kontrolle für die membrangebundene Phytoensynthaseaktivität diente jeweils ein Inkubationsansatz mit Membranen (0,75 mg Protein). Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Ein Vergleich der Phytoensynthaseaktivitäten in Solubilisat und Pellet zeigt, daß durch Behandlung der Membranfraktion mit hohen Ionenstärken (0,5-2 M KCl) die Phytoensynthase nur in recht geringem Maße (1,5-3 %) von der Membran freigesetzt werden kann; die Phytoensynthaseaktivität bleibt also überwiegend membrangebunden (77,4-79 %).

Während die Phytoensynthase bei *Phycomyces* durch 0,2-0,5 M Tris-Puffer (Bramley, 1985) bzw. bei *Narcissus* durch 10 mM MgCl_2 -Behandlung (Kreuz et al., 1982) von der Membran gelöst werden kann, ist es bei *Neurospora* nicht möglich unter vergleichbaren Bedingungen (0,2 M Tris-HCl und 18,8 mM MgCl_2) eine gegenüber der KCl-Behandlung effektivere Solubilisierung der Phytoensynthase zu erreichen.

Tabelle 4:

Phytoensynthaseaktivität (% vom Gesamteinbau und cpm/mg Protein) in der Membranfraktion und nach Solubilisierung mit verschiedenen Salzkonzentrationen in Solubilisat und Pellet. (Mittelwerte aus 3 Versuchen).
 Enzymtest: Membranen (0,75 mg Protein) bzw. 1 mg solubilisiertes oder noch membrangebundenes Protein; 4 mg Lipide; Salzkonz.: 70 - 130 mM KCl bzw. 18,8 mM $MgCl_2$.

Salz- konz. Frakt.	Einbau von Radioaktivität in Phytoen:			
	0,5 M KCl (%) (cpm/mg Prot.)	1 M KCl (%) (cpm/mg Prot.)	2 M KCl (%) (cpm/mg Prot.)	18,8 mM $MgCl_2$ (%) (cpm/mg Prot.)
Membranfkt.	76,3 1 037 680	79,8 1 030 820	75,6 1 041 510	— —
Solubilisat + Lipide	2,1 17 100	1,5 12 820	3,0 28 080	1,7 19 150
nicht-sol. Material ("Pellet")	77,7 1 198 240	77,4 1 054 430	79,0 1 041 510	79,8 1 191 680
Sol. Protein (%)	10,7	12,2	15,0	8,1

1.2.2. Solubilisierung der Phytoensynthese mit CHAPS

Da eine Solubilisierung der Phytoensynthese von *Neurospora crassa* mit hohen Salzkonzentrationen nicht möglich war, mußte eine stärkere Assoziation des Enzyms mit der hydrophoben Lipidmatrix der Membran angenommen werden, als sie allgemein für periphere Membranproteine charakteristisch ist (Freedman, 1981; Van Renswoude, 1985). Demzufolge wurde eine Solubilisierung der Phytoensynthese mit Detergenzien versucht. Bereits in früheren Untersuchungen wurde durch Behandlung der Membranfraktion mit verschiedenen Detergenzien wie Tween 20 (1% w/v Endkonz.), Tween 80 (0,5 und 1 % w/v), Triton X-100 (1 % w/v), Na-Cholat (1 % w/v) und Na-Desoxycholat (1 % w/v) eine partielle Solubilisierung der membrangebundenen, carotinoidbildenden Enzyme erreicht (Mitzka-Schnabel, 1981; Eiberger, 1983). Hinsichtlich Solubilisierungsrate, Carotinoidsyntheseaktivität und im Hinblick auf weitere Reinigungsschritte waren die Solubilisierungsversuche aber relativ wenig befriedigend.

Aus der Vielzahl von Detergenzien (s. Helenius et al., 1979) wurde schließlich CHAPS, ein zwitterionisches Detergenz, ausgewählt, weil es die für eine Solubilisierung günstigen Eigenschaften der Gallensalze sowie die der N-Alkyl-Sulfobetaine aufweist (Hjelmeland et al., 1980; 1983). Zudem wurde CHAPS bereits auf Grund seiner guten disaggregierenden Eigenschaften, ohne aber dabei denaturierend zu wirken, bei zahlreichen Untersuchungen zur Solubilisierung von membrangebundenen Enzymen bei Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren verwendet (Hjelmeland, 1980; Simonds et al., 1980; Rivnay et al., 1982).

1.2.2.1. Einfluß der CHAPS-Konzentration auf die Solubilisierung von Membranproteinen und Lipiden

Um eine prinzipielle Entscheidung treffen zu können, ob CHAPS für eine effektive Solubilisierung der Phytoensynthese geeignet ist, sollten zunächst die solubilisierenden Eigen-

schaften von CHAPS auf Membranproteine und Membranlipide von *Neurospora* näher untersucht werden.

Dazu wurde die Membranfraktion (Gewinnung s. Abschnitt II.2.2.) mit verschiedenen CHAPS-Konzentrationen inkubiert. Die Solubilisierungsbedingungen und die einzelnen Arbeitsschritte sind in Abschnitt II.2.3. beschrieben. In den resultierenden 120 000 g-Überständen (Solubilisate) wurde anschließend die Menge an solubilisiertem Protein bestimmt bzw. z.T. die Menge an gelösten Lipiden ermittelt. Wie Abb. 6 zeigt, weist die Solubilisierungskurve eine sigmoide Form auf. Der Kurvenverlauf resultiert dabei aus dem kooperativen Effekt der Detergenzmoleküle bei der Micellenbildung. Durch den steilen Anstieg der Solubilisierungseffektivität bei einer CHAPS-Konzentration von 6-8 mM ist die kritische Micellenkonzentration (CMC) im verwendeten Puffersystem charakterisiert (Hjelmeland, 1978). Die ermittelte CMC von 6-8 mmol/l für CHAPS steht in guter Übereinstimmung mit anderen Ergebnissen (Hjelmeland, 1980; Chattopadhyay et al., 1984).

Bei einer CHAPS-Konzentration von 10 mmol/l werden 26 % der Membranproteine solubilisiert. Eine Erhöhung der CHAPS-Konzentration bis zu 50 mmol/l führt zu keiner höheren Solubilisierungsrate; bei einer deutlich größeren Detergenzkonzentration von 100 mmol/l können 37 % der Membranproteine gelöst werden.

In Tab. 5 sind im Vergleich die solubilisierenden Eigenschaften von CHAPS auf die Membranproteine und Membranlipide dargestellt. Durch CHAPS wird dabei offensichtlich ein höherer prozentualer Anteil an Phospholipiden als an Proteinen aus der Membran gelöst, was zu einer Erhöhung des Lipid/Proteinverhältnisses im Solubilisat führt. Darüberhinaus nimmt die Solubilisierungsrate von Phospholipiden mit zunehmender Detergenzkonzentration stärker zu als die von Proteinen.

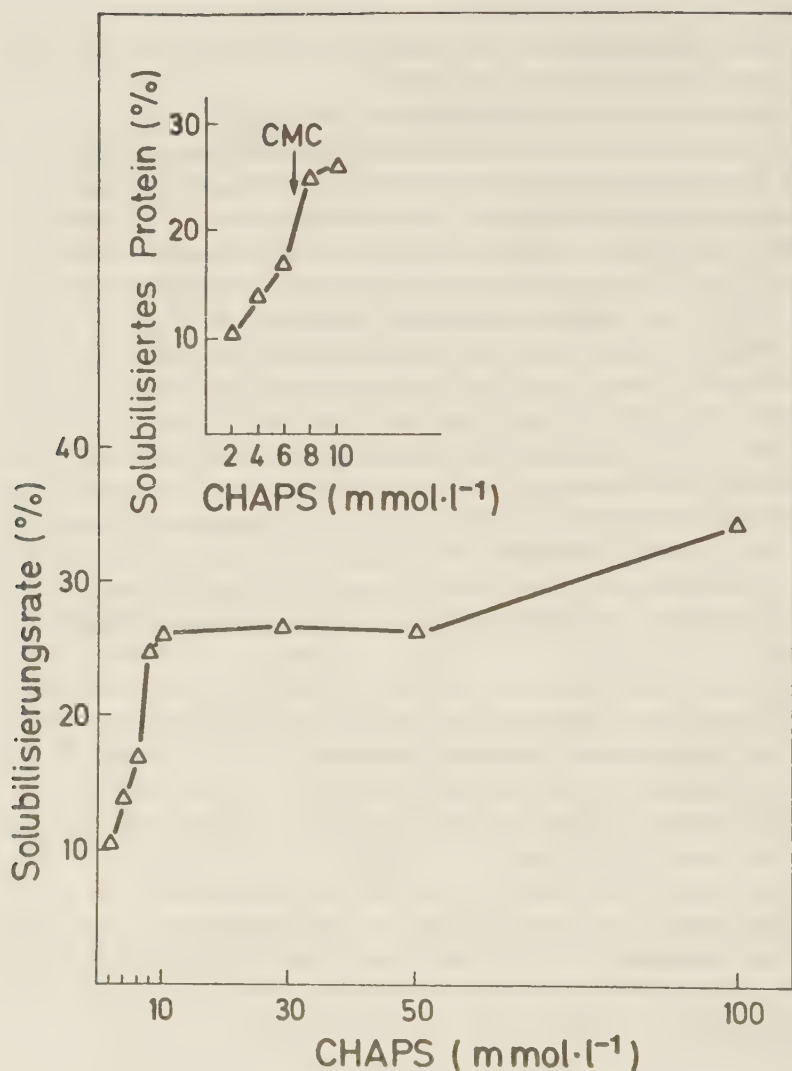


Abb. 6:

Einfluß von verschiedenen CHAPS-Konzentrationen auf die Solubilisierungsrate von Protein und die Charakterisierung der kritischen Micellenkonzentration (CMC). (Mittelwerte aus 2 Versuchen mit je 2 Parallelproben). Angabe des solubilisierten Proteins als Prozent vom membran-gebundenen Protein (= 100 %).

Tabelle 5:

Protein und Phospholipidmengen in verschiedenen Fraktionen nach Solubilisierung der Membranfraktion mit 10 - 50 - 100 mmol/l CHAPS. (Mittelwerte aus 3 Versuchen).

Fraktion	Protein (mg) (%) -sol.		Phospholipide (mg) (%) -sol.		Lipide/Protein (mg/mg)
Membranfrkt.	100		55-60		0,55-0,6
"10 mM-Sol."	27	27	32-35	59	1,2 -1,3
"10 mM-Pellet"	68		17-20		0,25-0,3
"50 mM-Sol."	28	28	39	68	1,4
"100 mM-Sol."	37	37	48	84	1,3

Da bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen der "10 bzw. 100 mM-Solubilisate" keine Membranstrukturen in den 120 000 g-Überständen erkennbar waren und somit keine größere Kontamination durch membrangebundenes Material vorlag, konnte man von einer effektiven Solubilisierung mit CHAPS ausgehen. Da durch CHAPS möglicherweise eine selektive Solubilisierung von Proteinen bzw. Lipiden erfolgen könnte, wurden zunächst die Proteine der Membranfraktion, der "10 und 100 mM-Solubilisate" bzw. der "10 und 100 mM-Pellets" über eine 2-dimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (s. Abschnitt 11.3.6.) aufgetrennt und verglichen. Die Proteinmuster der verschiedenen Solubilisate zeigen dabei weitgehende Übereinstimmung mit dem der Membranfraktion (Abb. 7), was als Hinweis dafür gelten kann, daß die Membranproteine durch CHAPS nicht selektiv solubilisiert werden.

← IEF

PAGE
↓

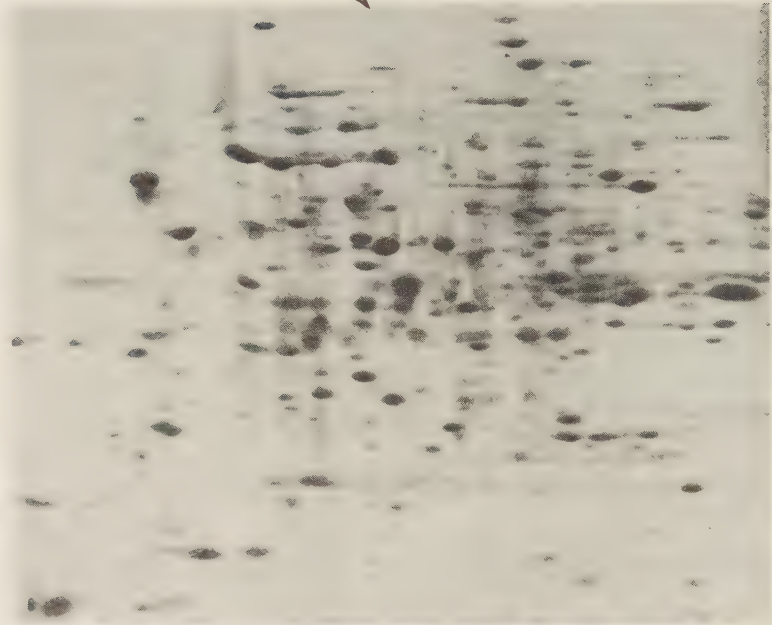


Abb. 7:

Polypeptidmuster der Membranfraktion (600 µg Protein) nach Auftrennung über 2-dimensionale SDS-Gelelektrophorese. Die Anfärbung der Polypeptide erfolgte durch Coomassie.

Daneben wurden die Lipide, die aus der Membranfraktion und aus den verschiedenen Solubilisaten (10 bzw. 100 mM) extrahiert wurden (Extraktion nach Folch; s. Abschnitt II.2.5.1.), auf qualitative und quantitative Unterschiede hin analysiert. Dazu wurden die Lipide zum einen über Dünnschichtchromatographie 1- bzw. 2-dimensional aufgetrennt (siehe Abschnitt II.2.5.2.1.). Andererseits wurde eine Quantifizierung der einzelnen Lipidkomponenten durch densitometrische Bestimmung versucht und die Fettsäurekomponenten der Lipide durch Gaschromatographie (s. Abschnitt II.2.5.2.3.) ermittelt. Unter Berücksichtigung der methodisch bedingten Schwankungen konnten bei vergleichender Lipidanalyse der verschiedenen

Fraktionen keine deutlichen Änderungen weder im Lipidmuster noch bei der quantitativen Bestimmung der einzelnen Lipidkomponenten und der Fettsäurezusammensetzung zwischen Membranfraktion, Solubilisat und Pellet festgestellt werden (Abb. 8). Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen in Abb. 7 und 8 geschlossen werden, daß durch CHAPS keine konzentrationsabhängige selektive Solubilisierung von Proteinen bzw. Lipiden aus Membranen von *Neurospora* erfolgt.

Auf Grund dieser Befunde, wäre eine CHAPS-Konzentration von 10 bzw. 100 mmol/l gleichermaßen geeignet um die Phytoensynthese von der Lipidmatrix zu lösen.

1.2.2.2. Einfluß von CHAPS-Monomeren auf das Kürbissystem und die membrangebundenen Enzyme

Es wäre denkbar, daß trotz effektiver Solubilisierung der Phytoensynthese die enzymatische Aktivität im kombinierten Enzymtest nicht nachgewiesen werden kann, weil die vorhandenen CHAPS-Konzentrationen einen schädigenden Effekt auf das GGPP-liefernde Kürbissystem oder auf die Phytoensynthese selbst ausüben. Um dies zu klären, mußte zuerst die CHAPS-empfindlichkeit des kombinierten in-vitro Testsystems näher untersucht werden.

Dazu wurden Membranen (0,75 mg Protein) mit dem GGPP-liefernden Kürbisendosperm bei verschiedenen CHAPS-Konzentrationen 6 h lang inkubiert. Die gewählten Detergenzkonzentrationen (0-7 mmol/l) lagen stets unterhalb der CMC (kritischen Micellenkonzentration); dadurch wurde ausschließlich der Einfluß von CHAPS-Monomeren untersucht, ohne daß Solubilisierungseffekte ins Spiel kamen. Bei der Zugabe der CHAPS-Lösung (10 mg/ml) sollten durch ständiges Rühren überdies lokale Konzentrationserhöhungen über die CMC verhindert werden; dadurch konnten partielle Solubilisierungsvorgänge durch entstehende CHAPS-Micellen ausgeschlossen werden.

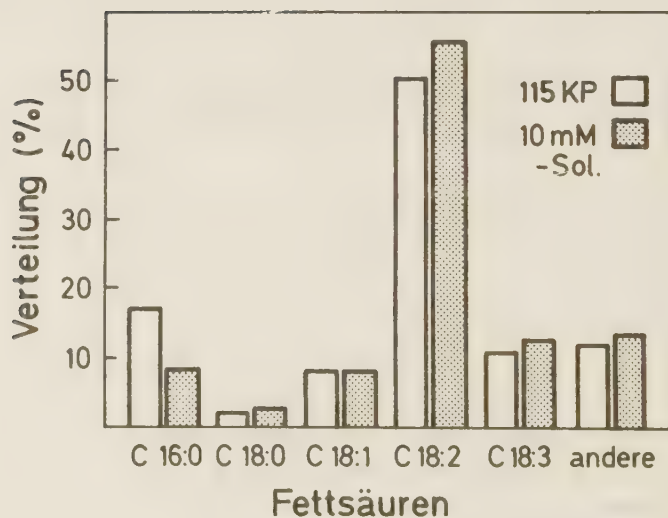
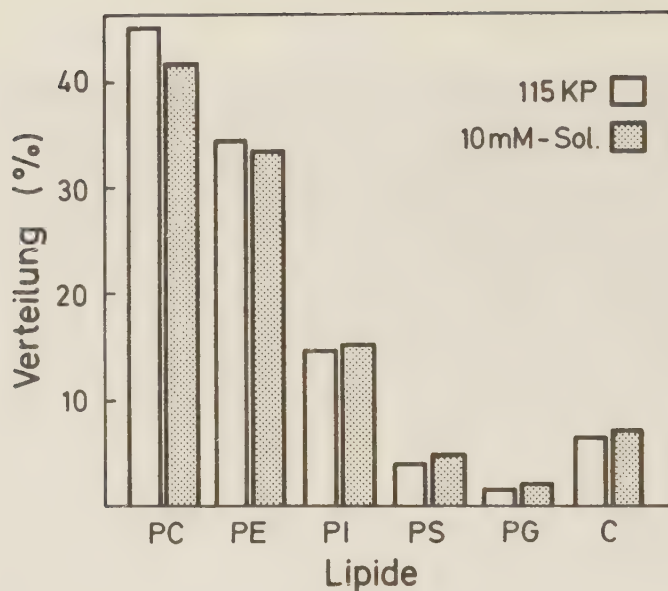


Abb. B:

Verteilung der Lipide und ihrer Fettsäurekomponenten in der Membranfraktion (115 KP) und im "10 mM-Solubilisat" ("10 mM-Sol."). (Mittelwerte aus 2 Versuchen).

PC= Phosphatidylcholin; PE= -ethanolamin; PI= -inosit;
PS= -serin; PG= -glycerin; C= Cardiolipin.

Abb. 9 zeigt den Einfluß von verschiedenen CHAPS-Konzentrationen auf die in-vitro Syntheseaktivität des GGPP-liefernden Kurbissystems und der membrangebundenen Enzyme. Der Einbau von Radioaktivität in die nicht verseifbare lipophile Fraktion (Gesamteinbau) blieb bis zu einer eingesetzten CHAPS-Konzentration von 7 mmol/l unbeeinflußt. Auf Grund dieser Tatsache zeigen die gewonnenen Ergebnisse, daß die GGPP-Synthese aus MVA durch das Kurbissystem ebenfalls bis zu dieser Konzentration nicht geschädigt wird. Während das gebildete GGPP bei relativ geringen CHAPS-Konzentrationen bis zu 2,5 mmol/l hauptsächlich von der Phytoensynthese weiter umgesetzt wird, nimmt bei höheren Detergenzkonzentrationen (3-7 mmol/l) die Kaurenbildung drastisch zu.

Auf Grund dieser Befunde lassen sich über die CHAPS-Sensitivität der beteiligten Enzymsysteme folgende Aussagen treffen: Das GGPP-synthetisierende System wie auch die Kaurensynthese des Kurbissystems bleiben von der in-vitro vorgegebenen Detergenzkonzentration (0-7 mM) weitgehend unbeeinflußt. Die membrangebundene Phytoensynthese wird aber durch eine CHAPS-Konzentration von $>2,5$ mmol/l bereits deutlich geschädigt. Diese Konzentration führt auch zu einer Aktivitätsverminderung der nachfolgenden carotinoid-synthetisierenden Enzyme, was auch Ausdruck einer Substrat-limitierung sein kann.

Die mit den membrangebundenen Enzymen gewonnenen Erkenntnisse über die CHAPS-Toleranz im kombinierten in-vitro Testsystem sollten schließlich mit gewissen Vorbehalten auch auf die solubilisierete Phytoensynthese übertragbar sein. Bei in-vitro Tests mit den solubilisierten Proteinen wurde daher stets eine CHAPS-Konzentration eingestellt, die deutlich unter 3 mmol/l lag, meistens < 2 mM.

1.2.2.3. Bestimmung der Phytoensyntheseaktivität nach Solubilisierung

Unter Berücksichtigung der in Abschnitt III.1.2.2.1. (Abb. 6)

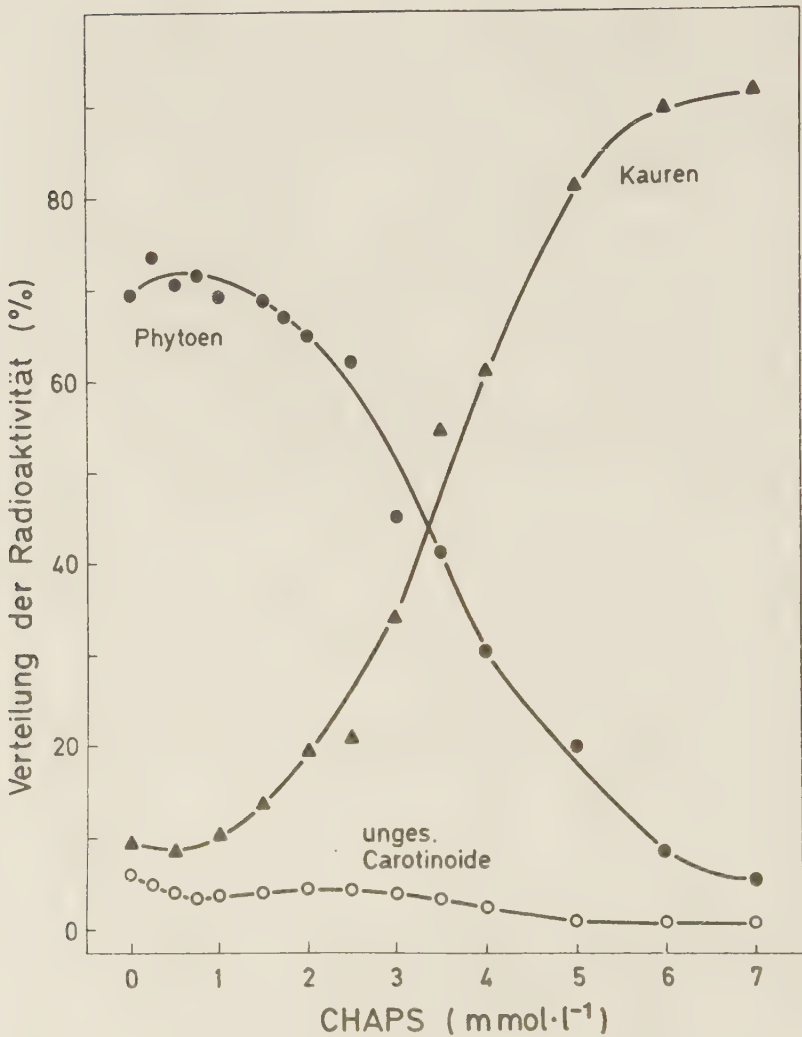


Abb. 9:

Einfluß von verschiedenen CHAPS-Konzentrationen ($< \text{CMC}$; nur Chaps-Monomere) auf die in-vitro Syntheseaktivität (% vom Gesamteinbau) des GGPP-liefernden Kürbissystems und der membrangebundenen Enzyme. (Mittelwerte aus 4 Versuchen). Enzymquelle: Membranen ($0,75 \text{ mg Protein}$); Inkubation: 6 h.

aufgezeigten Solubilisierungseigenschaften von CHAPS sollte zunächst versucht werden, die Phytoensynthase unter möglichst schonenden Bedingungen unter Beibehaltung der Aktivität von der Membran zu lösen.

Die gewählte CHAPS-Konzentration von 10 mmol/l gewährleistet zum einen, daß selbst stark mit der Lipidschicht assoziierte Proteine in Form von sog. "Mischmicellen" freigesetzt werden und zum anderen daß eine Denaturierung weitgehend ausgeschlossen werden kann (Cook et al., 1986).

Die Solubilisierung mit CHAPS ist in Abschnitt II.2.3. beschrieben. Nach 1-stündiger Inkubation der Membranfraktion mit einer CHAPS-Konzentration von 10 mmol/l wurden durch Zentrifugation (120 000 g) die solubilisierten Proteine ("10 mM-Solubilisat") von noch membrangebundenem Material ("10 mM-Pellet") abgetrennt und beide Fraktionen (jeweils 1,0 mg Protein) im kombinierten in-vitro Test auf Phytoensynthaseaktivität hin untersucht. Bei Solubilisierung mit 10 mmol/l CHAPS sollten größtenteils relativ heterogene Protein-Lipid-CHAPS-Mischmicellen entstehen und zu einem geringen Anteil auch Lipid-CHAPS-Micellen (Hjelmeland, 1984; Tanford et al., 1976). Nachdem zu diesem Zeitpunkt noch nicht klar war, inwieweit dieser sog. "endogene Lipidpool" des "10 mM-Solubilisats" (Protein-Lipid-CHAPS- und Lipid-CHAPS-Micellen) für eine Lipidaktivierung der solubilisierten Phytoensynthase in Frage kommt, wurden Membranlipide (4 mg Phospholipide $\hat{=}$ 0,7 mmol/l) zugesetzt (s. Abschnitt II.2.6.). Diese Lipide erschienen am geeignetsten, um die nach Solubilisierung gestörte Membrenumgebung wiederherzustellen, die für viele Membranproteine unbedingt erforderlich ist, um ihre volle katalytische Aktivität entfalten zu können (Freedman, 1981; Bohnenberger et al., 1983; Russ et al., 1988).

Die CHAPS-Konzentration während des Enzymtests lag bei 0,5 mmol/l, bedingt durch die Zugabe von 1 mg Protein aus dem "10 mM-Solubilisat", also bei einer Konzentration, die deutlich unter derjenigen liegt, bei der ein schädigender Einfluß auf die membrangebundene Phytoensynthase zu erkennen war

(>2,5 mmol/l; siehe Abb. 9).

Wie Tabelle 6 zeigt, kann mit 10 mmol/l CHAPS eine partielle Solubilisierung der Phytoensynthese in enzymatisch aktiver Form erreicht werden.

Tabelle 6:

Phytoensyntheseaktivität (% vom Gesamteinbau und cpm/mg Protein nach Solubilisierung mit verschiedenen CHAPS-Konzentrationen (10 - 50 - 100 mmol/l). (Mittelwerte aus 3 Versuchen).

Enzymtest: 1 mg Protein; 4 mg Phospholipide/mg Protein; 0,5-1,3 mM CHAPS; 6 h.

Fraktion	Einbau von Radioaktivität in Phytoen	
	(%)	(cpm/mg)
"10 mM-Solubilisat"	13,8	158 280
"50 mM-Solubilisat"	0,8	11 270
"100 mM-Solubilisat"	0,4	5 020

Im Vergleich zu den Solubilisierungsversuchen mit 0,5-2 M KCL war mit CHAPS der spezifische Einbau des 120 000 g-überstandes (Solubilisates) in Phytoen von 28 100 cpm/mg Protein auf 158 300 cpm/mg Protein deutlich erhöht.

Außerdem wurde versucht, eine Solubilisierung der Phytoensynthese mit sehr viel höheren CHAPS-Konzentrationen (50-100 mmol/l) durchzuführen. Die Intention dabei war, lipidfreie Protein-CHAPS-Micellen zu erhalten, die nur ein Polypeptid enthalten; dies wäre Voraussetzung für bestimmte nachfolgende Aufreinigungsschritte und für die Untersuchung von spezifischen Lipidanforderungen der Phytoensynthese (Helenius and Simons, 1975).

Bevor die "50 bzw. 100 mM-Solubilisate" im in-vitro Test auf ihre Phytoensyntheseaktivität hin untersucht werden konnten, mußte sowohl für die Rekonstitution wie auch für den Enzymtest erst die Detergenzkonzentration der Proben auf 10 mmol/l reduziert werden. Dazu wurden die "50 und 100 mM-Solubilisate" mit Puffer auf 20 mmol/l CHAPS verdünnt und anschließend die Lipid- und Protein-Micellen wieder mit einer Amiconrührzelle über eine hydrophile Ultrafiltrationsmembran YM 30 (mit nomineller Ausschlußgrenze von 30 kD; Amicon) konzentriert. Reine CHAPS-Micellen (6-10 kD; Beyer et al., 1985) wurden dabei aus dem Solubilisat entfernt. Für die Rekonstitution der solubilisierten Proteine wurde das auf 20 mmol/l CHAPS verdünnte Solubilisat (2 ml) schnell im Verhältnis 1:1 mit Neurospora-Lipidvesikeln gemischt (Rekonstitutionskonzentration: 10 mM). Die Insertion der Proteine in die Lipidvesikel erfolgte nach der Sonifizier- oder Freeze-thaw-Technik (s. Abschnitt II.2.6.). In Vorbereitung auf den in-vitro Test mußte schließlich die Enzymlösung nochmals über YM 30-Membranfilter konzentriert werden, so daß letztlich im Enzymtest bei Zugabe von 1 mg Protein (1,2 ml) eine CHAPS-Konzentration von 1,3 mmol/l eingestellt werden konnte. Die Phytoensyntheseleistung des "50 bzw. 100 mM-Solubilisats" sind in Tabelle 6 dargestellt. Wie die äußerst geringen ^{14}C -Einbauraten in Phytoen deutlich machen, sind diese hohen Detergenzkonzentrationen (50 bzw. 100 mmol/l CHAPS) nicht geeignet, um die solubalisierte Enzymaktivität im in-vitro Test nachweisen zu können.

1.2.3. Reaktivierung der Phytoensynthese

Nachdem die Phytoensynthese unter Erhaltung ihrer enzymatischen Aktivität solubalisiert werden konnte, war nun zu prüfen inwieweit eine höhere Enzymaktivität im in-vitro Test erreicht werden kann.

Da im kombinierten Enzymtest eine starke Konkurrenz um das vom Kürbisendosperm gelieferte Substrat GGPP besteht, war zu

erwarten, daß die aus ihrem natürlichen Lipidverband gelöste Phytoensynthese in der Konkurrenz um das GGPP gegenüber dem kürbiseigenen, kaurensynthetisierenden System weit unterlegen ist. Deshalb war es zunächst erforderlich, Bedingungen zu erarbeiten, die eine Reaktivierung der solubilisierten Phytoensyntheseaktivität ermöglichten.

Erfolgsversprechend erschien dabei der Weg, das fehlende bzw. gestörte natürliche Lipidmilieu zu rekonstituieren. Grundsätzlich mußte dazu erst die Frage geklärt werden, welche Technik unter der Fülle von Rekonstitutionstechniken (Racker, 1979; Racker et al., 1979) am geeignetsten wäre, um die solubilisierten Proteine zu reaktivieren.

1.2.3.1. Rekonstitutionstechniken

Unter den möglichen Rekonstitutionstechniken kamen neben der Detergenz-Dialyse-Technik (Kagawaha et al., 1971; Racker et al., 1973) und Fusionstechnik mit Dimyristylphosphatidylcholin und Myristat (Scotto et al., 1985; Dencher et al., 1986), vor allem die Sonifiertechnik (Cocucci et al., 1981; Mazliak et al., 1985) und Freeze-thaw-Sonifiertechnik (Scarborough et al., 1984; Beyer et al., 1985) in die nähere Wahl. Folgende Auswahlkriterien waren dabei entscheidend: Der Zeitfaktor, Vermeiden von extremen Verdünnungsschritten (wobei sich im Falle der Phytoensynthese der nachfolgende Konzentrierungsschritt als problematisch erweist), gute Reproduzierbarkeit und schließlich erschienen diese 4 Techniken auf Grund von Literaturhinweisen als recht erfolgsversprechend, um enzymatisch aktive Proteolipid-Komplexe zu bilden. Vorversuche zeigten, daß Sonifizierungs- und Freeze-thaw-Sonifiertechnik dabei am besten geeignet waren. Mit diesen beiden Rekonstitutionstechniken wurde daher routinemäßig die Insertion der solubilisierten Proteine in die Lipidvesikel durchgeführt. Während der Rekonstitution wurde eine CHAPS-Konzentration von 10 mmol/l eingestellt. Grundlage für diese gewählte Detergenzkonzentration waren zunächst Hinweise aus der Literatur (Beyer et al., 1985; Cook et al., 1986), die schließlich durch eigene

Versuchsergebnisse (s. Abschnitt III.1.2.3.4.) bestätigt werden konnten.

1.2.3.2. Einfluß der Protein- und Lipidmenge

Nachdem in orientierenden Versuchen eine Lipidzugabe durch Freeze-thaw- und Sonifizierttechnik zu einer befriedigenden Enzymaktivität der Phytoensynthase führte, sollte nun der Einfluß der eingesetzten Lipidmenge auf die Phytoensynthaseaktivität genauer untersucht werden.

Zum einen war zu prüfen, ob der sog. "endogene Lipidpool", d.h. die als CHAPS-Protein-Lipid-Micellen und reine Lipid-Detergenz-Micellen vorliegenden Lipide des "10 mM-Solubilisates" nicht bereits für eine gute enzymatische Aktivität ausreichen bzw. ob durch zusätzliche exogene Membranlipide noch eine Steigerung der Phytoensynthaseleistung erreicht werden kann.

Über das spezifische Lipidrequirement der Phytoensynthase ist bisher nichts bekannt. Um aber trotzdem das nach Solubilisierung fehlende bzw. gestörte Lipidmilieu möglichst effektiv zu rekonstituieren, wurden die gesamten aus der Membranfraktion extrahierten Lipide eingesetzt. Damit sollten auch spezifische Anforderungen der Phytoensynthase hinsichtlich Polarität und "Fluidität" der Lipide erfüllt werden (Bohnenberger et al., 1983), was u.U. bei Zugabe einer speziellen Phospholipidkomponente wie z.B. Phosphatidylcholin nicht der Fall wäre.

Die Quantifizierung der Membranlipide von Neurospora erfolgte über eine Phospholipidbestimmung. Nachdem Phospholipide (46 % Phosphatidylcholin; 35 % Phosphatidylethanolamin; 15 % Phosphatidylinosit; s. Abb. 8) zusammen mit Ergosterin den Hauptanteil der Lipide in der Membranfraktion (ER und Plasmamembranen) ausmachen (Hallermeyer et al., 1974; Bowmann et al., 1987; eigene Lipidanalysen), sollte eine Phospholipidbestimmung (s. Abschnitt II.2.5.2.) eine relativ gute Quantifizierung der gesamten Membranlipide zulassen.

Für diese Untersuchungen wurden 2,5 mg solubilisiertes Protein mit zunehmenden exogenen Lipidmengen (0-20 mg = 0-3,45 mmol/l Phospholipide) inkubiert. Dabei zeigte sich, daß mit zunehmenden Lipidmengen die in-vitro Syntheseleistung der Phytoensynthase eindeutig gesteigert werden kann. Während Lipidmengen von 0,26-1,46 mmol/l zu einem deutlichen Anstieg der Enzymaktivität führen, wirkt eine weitere Erhöhung der Lipidkonzentration auf 1,85 mmol/l bereits hemmend auf die ^{14}C -Markierung von Phytoen. Bezieht man die vorliegende Proteinmenge (2,5 mg) mit ein, so bedeutet dies, daß ein Lipid:Protein-Verhältnis von 0,6 bis 3,3 zu einem Anstieg der Enzymaktivität führt, während eine Erhöhung des Lipid:Protein-Verhältnisses auf 4,3 bereits hemmend wirkt.

Im folgenden wurden daher, falls nicht anders beschrieben, bei der Rekonstitution der solubilisierten Phytoensynthase ein Lipid:Protein-Verhältnis von 3,2 verwendet entsprechend einer Lipidkonzentration von 1,4 mmol/l. Die Zugabe von exogenen Lipiden erfolgte nach der Sonifiziertechnik bei einer CHAPS-Konzentration von 10 mmol/l.

Durch Erhöhung der eingesetzten Menge an solubilisiertem Neurospora-Protein ("10 mM-Solubilisat") einerseits, sowie durch eine dem Enzymtest vorgeschaltete Lipidaktivierung der solubilisierten Enzyme andererseits, sollte versucht werden, die in-vitro GGPP-Metabolisierung der solubilisierten Phytoensynthase gegenüber dem kaurenbildendem Kürbissystem entscheidend zu fördern.

Dabei konnte solubilisiertes Protein nicht in unbegrenzter Menge eingesetzt werden, weil das Protein jeweils in Form von CHAPS-Protein-Micellen zugegeben wird und somit mit steigender Proteinmenge stets auch eine Erhöhung der Detergenzkonzentration einhergeht (s. Abschnitt III.1.2.2.2.).

Es wurden 0,6-4 mg Protein des "10 mM-Solubisates" mit oder ohne vorausgegangene Lipidaktivierung mit dem GGPP-synthetisierenden Kürbissystem 6 Stunden lang inkubiert (in-vitro Test s. Abschnitt II.2.7.1.). Die verschiedenen CHAPS-Konzentrationen der einzelnen Inkubationsansätze (0,3-2,2 mmol/l) resultierten aus der Zugabe von 0,5-4 mg Protein

in Form von CHAPS-Protein-Micellen. Auf Grund der CHAPS-Sensitivität des kombinierten Enzymtestes (siehe Abschnitt II.1.2.2.2.) sollte sich bei einer Detergenzkonzentration von 2,2 mmol/l noch kein schädigender Einfluß auf die GGPP-Bildung und die Phytoensynthaseaktivität zeigen.

In Abb. 10 und Tabelle 7 ist die Syntheseleistung des "10 mM-Solubilisates" im kombinierten Enzymtest in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge und der Zugabe von exogenen Membranlipiden dargestellt. Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß durch eine Erhöhung der eingesetzten Menge an solubilisiertem Protein die Umsetzung des Substrates GGPP zu Phytoen signifikant gefordert wird; diese Steigerung der in-vitro Phytoensynthese kann nochmals durch eine dem Enzymtest vorgeschaltete Rekonstitution der solubilisierten Enzyme um den Faktor 2 verstärkt werden.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen (Abb. 11), daß bei diesem Rekonstitutionsvorgang mit dem "10 mM-Solubilisat" Liposomen mit einem Durchmesser von etwa 30 nm entstanden sind. Es konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden, ob die solubilierte Phytoensynthase in diese aus *Neurospora*-Membranlipiden gebildeten Liposomen inkorporiert war.

Da der ^{14}C -Gesamteinbau in die nicht verseifbare lipophile Fraktion mit steigender Menge an solubilisiertem Protein abnahm, ergab sich bei diesen Proben letztlich keine dem prozentualen Anstieg äquivalente Steigerung der ^{14}C -Markierung des Phytoens. Diese Tendenz war bei lipidaktivierten Proben nicht nachzuweisen.

Um die in-vitro Aktivität der Phytoensynthase zu überprüfen wurde daher bei allen weiteren Untersuchungen 2,5 mg Protein des "10 mM-Solubilisats" als Enzymquelle eingesetzt. Diese Proteinmenge gewährleistete eine hohe in-vitro Phytoensynthese, ohne daß dabei eine erkennbare Schädigung von CHAPS ausging. Vor dem in-vitro Test wurde die gelöste Phytoensynthase durch Zugabe von 8 mg Membranlipiden ($\hat{=}$ 1,4 mmol/l Phospholipiden) rekonstituiert. Die Aktivierung, falls nicht anders beschrieben, wurde nach der Sonifiertechnik bei einer CHAPS-Konzentration von 10 mmol/l durchgeführt. Für

den Enzymtest wurde die Detergenzkonzentration auf 1,3 mmol/l verdünnt.

Tabelle 7:

Syntheseleistung (% vom Gesamteinbau und cpm) des "10 mM-Solubilisats" im kombinierten System in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge und der Zugabe von exogenen Lipiden. (Mittelwerte aus 3 Versuchen).
Lipid:Proteinverhältnis 3,2-4. Inkubation: 6 h, 27°C.
n.v.l.Frkt. = nicht verseifbare lipophile Fraktion.

Bedingungen		Einbau von Radioaktivität in				
Protein (mg)	Lipide (+/-)	n.v.l.Frkt. (cpm)	Phytoen (%) (cpm)		Kauren (%) (cpm)	
0,6	-	1 029 040	1,6	16 460	85,3	877 770
	+	933 000	5,5	50 940	83,5	778 870
1,0	-	1 227 070	6,4	78 530	86,5	1061 540
	+	1 148 620	13,8	158 280	75,8	871 230
2,0	-	1 114 480	13,7	152 910	73,3	789 940
2,5	-	878 620	16,2	142 600	70,0	622 770
	+	1 147 020	30,9	353 860	53,1	608 840
3,0	-	939 200	26,2	245 700	57,0	535 250
	+	1 077 340	40,2	432 980	41,9	451 000
3,4	+	1 110 880	43,1	479 120	38,4	426 580
4,0	-	786 000	30,2	59 300	42,3	332 570

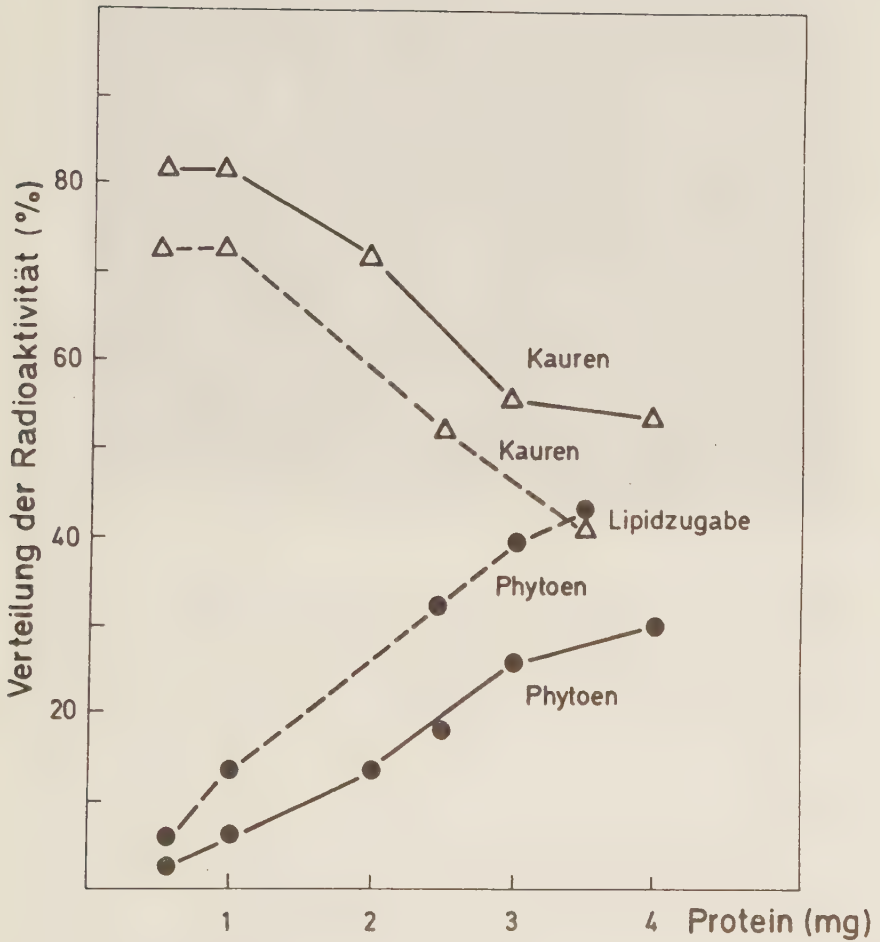


Abb. 10:

Einfluß der eingesetzten Protein- ("10 mM-Solubilisat") und Lipidmenge auf die in-vitro Syntheseaktivität (in % vom Gesamteinbau) der solubilisierten Phytoensynthese und des Kürbissystems. (Mittelwerte aus 3 Versuchen). Lipidzugabe bei 10 mM CHAPS; Lipid:Proteinverhältnis 3,2-4. Enzymtest: 0,3-2,2 mM CHAPS; 6 h.

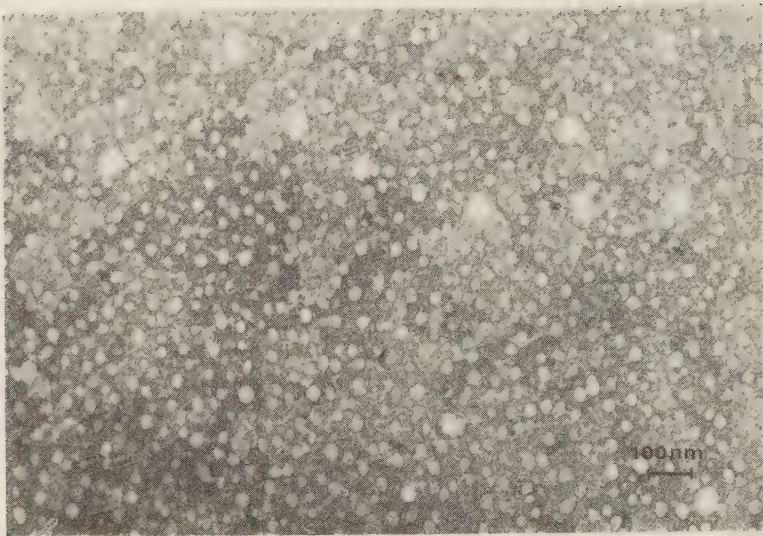


Abb. 11:

Elektronenmikroskopische Aufnahme der rekonstituierten Liposomen mit etwa 30 nm Durchmesser nach negativ Kontrastierung mit 1 % Phosphorwolframsäure. Rekonstitutionsansatz: "10 mM-Solubilisat" (2,5 mg Protein) und Membranlipide (8 mg). Rekonstitution durchgeführt nach der Sonifiertechnik. Balken entspricht 100 nm.

1.2.3.3 Kinetik

Aus Abb. 12 ist ersichtlich, daß der ^{14}C -Einbau ins Phytoen bis 2 Stunden nahezu linear verläuft. Nach einer 1-stündigen Inkubationszeit ist die spezifische Aktivität der solubilisierten und rekonstituierten Phytoensynthase am höchsten; dabei wurden in Gegenwart des GGPP-synthetisierenden Kürbissystems 130-160 pmol MVA pro mg Protein und min. ins Phytoen umgesetzt.

Obwohl nach 1-stündiger Inkubationszeit die höchste spezifische Aktivität erreicht wurde, wurde im Hinblick auf

eine ausreichende ^{14}C -Markierung von Phytoen in den folgenden Versuchen die Enzymreaktion erst nach 2 Stunden gestoppt. Außerdem war nach 1-stündigen Inkubationen die chromatographische Auftrennung der in-vitro-Syntheseprodukte auf Grund des hohen Lipidgehaltes und des geringen Gesamteinbaus erschwert.

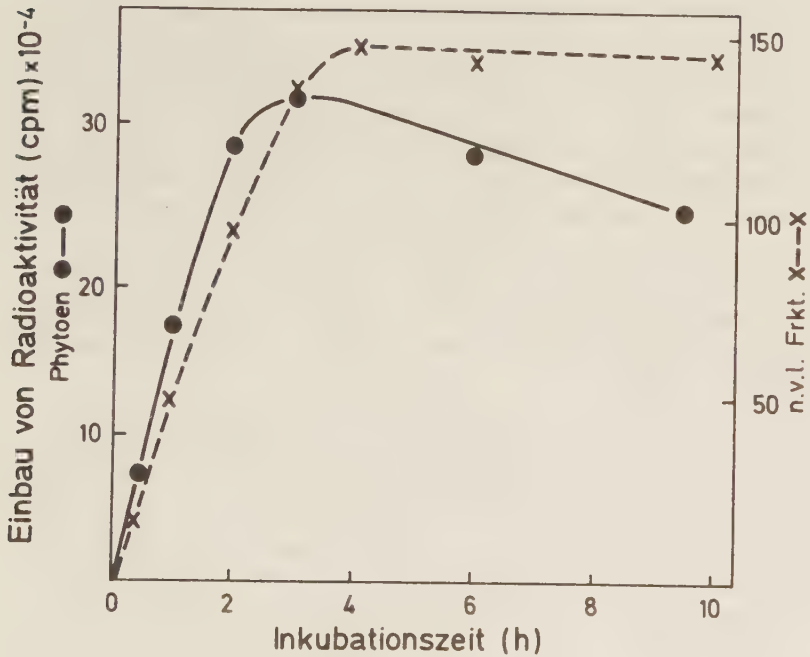


Abb. 12:

Zeitlicher Verlauf des Einbaus von Radioaktivität (cpm) in die nicht verseifbare lipophile Fraktion (n.v.l. Frkt.) und in Phytoen im "10 mM-Solubilisat" nach Lipid-Rekonstitution. (Mittelwerte aus 2 Versuchen).

Die eingesetzte Proteinmenge betrug 2,5 mg, aktiviert mit 8 mg Membranlipiden. CHAPS-Konz. während Rekonstitution bzw. Enzymtest: 10 bzw. 1,6 mM.

1.2.3.4. Optimierte Testbedingungen

Nachdem die bisherigen Ergebnisse gezeigt hatten, daß die Phytoensynthase reaktivierbar ist, sollte nun unter optimierten Testbedingungen hinsichtlich Protein- und Lipidmenge, Rekonstitutionstechnik, sowie Inkubationszeit die membrangebundene und solubilisierete Phytoensynthase verglichen werden. Des weiteren sollte der Einfluß der CHAPS-Konzentration, die während der Rekonstitution eingestellt wird, auf die Effektivität der Lipidaktivierung der solubilisierten Phytoensynthase überprüft werden. Für die möglichst vollständige Insertion der solubilisierten Proteine in die Lipidvesikel sollte vor allem die Stabilität der Mischmicellen wie auch die Stabilität der durch die Rekonstitution entstandenen Liposomen entscheidend sein; beides hängt im wesentlichen von der Detergenzkonzentration ab. Schließlich sollte noch versucht werden, durch Reduktion des eingesetzten Kürbisendosperms die GGPP-Metabolisierung durch das Kürbis-system zu verringern, damit mehr GGPP der Phytoensynthase zur Verfügung steht.

Während der Rekonstitution lag die CHAPS-Konzentration bei 5,3 bzw. 10 mmol/l (s. Abschnitt II.2.6.). Um die Aktivität der nicht-rekonstituierten Phytoensynthase nach Solubilisierung zu erfassen, wurden 2,5 mg Protein des "10 mM-Solubilisates" ohne Lipidzusatz inkubiert. Als GGPP-lieferndes System wurden 15 bzw. 30 mg über YM 30-Membranfilter konzentriertes Kürbis-endosperm dem Inkubationsansatz zugesetzt (s. Abschnitt II.2.7.1.).

Die in Tabelle B zusammengestellten Ergebnisse bestätigen eindeutig, daß die aus der natürlichen Lipidumgebung gelöste Phytoensynthase durch exogene Membranlipide aktiviert werden muß. Durch diese Lipidaktivierung kann die solubilisierete Phytoensynthaseaktivität um das 2,5-3-fache gesteigert werden; dies zeigt sich in einer Erhöhung der spezifischen Aktivität von 50 auf 130-160 pmol MVA/mg Protein und min..

Hingegen hat eine CHAPS-Konzentration von 5,3 bzw. 10 mM, die während der Rekonstitution eingestellt wurde, nur einen

Tabelle 8:

Vergleich der Phytoensyntheseaktivitäten (% vom Gesamteinbau, cpm/mg Prot. und pmol MVA/mg Prot.) im membranengebundenen und solubilisierten Zustand. Zusätzlich ist der Einbau von Radioaktivität in die nicht verseifbare lipophile Fraktion [n.v.l.Frkt.] (cpm) und in Kauren (% vom Gesamteinbau) angegeben. (Mittelwerte aus 3 Versuchen).

Enzymquelle: Membranen (0,75 mg Protein) bzw. 2,5 mg solubilisiertes Protein ("10 mM-Solubilizat"). Rekonstitution (Rek.) nach der Sonifiertechnik (S) bei verschiedenen CHAPS-Konz. (5,3 und 10 mM). Bei dem * Ansatz wurde die Hälfte der Kürbismenge (15 mg) für die GGPP-Synthese eingesetzt. Inkubationszeit: 2 h.

Fraktion	Einbau von Radioaktivität in:		Phytoen		Phytoen spez. Aktivität (pmol/mg Prot.)
	n.v.l.Frkt. (cpm)	Phytoen (%)	Kauren (%)	spez. Einbau (cpm/mg Prot.)	
Membranfrkt.	1 038 530	68,9	8,8	1 045 780	858
"10 mM-Sol."					
Rek.: —	487 720	35,2	66,9	63 190	50
5,3 mM; S.	866 630	45,9	36,7	159 150	130
10 mM; S.	988 560	49,1	34,3	194 270	160
* 10 mM; S.	874 360	60,5	17,2	211 660	175

geringen Einfluß auf die Aktivität der Phytoensynthase. Es scheint jedoch, daß die Lipidaktivierung am wirkungsvollsten bei 10 mmol/l CHAPS durchgeführt werden kann. Obwohl das GGPP-liefernde System auf die Hälfte reduziert war, trat keine Substratlimitierung für die Phytoensynthase ein; dadurch konnte im Gegenteil sogar die in-vitro Synthese von ^{14}C -Phytoen entscheiden von 49,1 auf 60,5 % gesteigert werden.

Durch Rekonstitution, wodurch die nach Solubilisierung gestörte Lipidumgebung der Phytoensynthase teilweise wiederhergestellt werden konnte, und durch das Erarbeiten von geeigneten Bedingungen für den kombinierten Enzymtest ist es gelungen, die Syntheseleistung der solubilisierten Phytoensynthase signifikant zu steigern. Die Aktivität der membrangebundenen Phytoensynthase wurde jedoch nicht erreicht.

1.2.4. Versuche zur Solubilisierung der weiteren carotinoidsynthetisierenden Enzyme

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, sollten die Enzyme, die Phytoen zu den ungesättigteren Carotinoiden umsetzen, auch bei *Neurospora crassa* als "integrale" Membranproteine einzuordnen sein. Voraussetzung für eine nähere Untersuchung dieser Enzyme, die möglicherweise eine Isomerase, Dehydrogenase(n), Cyclase(n) und eine Oxidase darstellen, ist eine Solubilisierung.

In Analogie zur Solubilisierung der Phytoensynthase wurde einmal versucht, möglichst schonend mit 10 mmol/l CHAPS (>CMC) die weiteren carotinoidsynthetisierenden Enzyme zu lösen, andererseits sollte nicht unberücksichtigt bleiben, daß unter Umständen höhere Detergenzkonzentrationen (75 mmol/l) nötig sein könnten, um die relativ starken Assoziationen von integralen Membranproteinen mit der Lipidmatrix zu zerstören. Die Membranfraktion wurde deshalb 1 h lang mit 10 bzw. 75 mmol/l CHAPS inkubiert. Die Solubilisierung ist in

Abschnitt II.2.3. beschrieben. Nach Zentrifugation (120 000 g/2,5 h) wurden die Überstände ("10 und 75 mM-Solubilisate") im in-vitro Test mit ^{14}C -Phytoen als Substrat (s. Abschnitt II.2.7.2.) auf ihre Isomerase-, Dehydrogenase-, Cyclase- und Oxidase-Aktivität hin untersucht. Um die Rekonstitution wie auch den Enzymtest bei geeigneten CHAPS-Konzentrationen durchführen zu können, mußte im "75 mM-Solubilisat" die Detergenzkonzentration auf 20 mmol/l verdünnt und nachfolgend das "20 mM-Solubilisat" mit einer Amiconrührzelle über YM 30-Membranfilter wieder konzentriert werden. Der analoge Vorgang wurde bereits in Abschnitt III.1.2.2.3. für die solubilisierete Phytoensynthase ausgeführt.

Als Substrat wurde das wasserunlösliche Phytoen in Form von Liposomen angeboten. Die Präparation der ^{14}C -Phytoen-Liposomen erfolgte wie unter Abschnitt III.1.1.2. beschrieben; lediglich der Lipidanteil war erhöht (8,0 mg Membranlipide und 535 000 cpm ^{14}C -Phytoen). Für die Rekonstitution wurde das "20 mM-Solubilisat" (2,5 mg Protein; 0,6 ml) schnell im Verhältnis 1:1 mit den ^{14}C -Phytoen-Liposomen gemischt. Die daraus resultierende CHAPS-Konzentration lag bei 10 mmol/l. Das "10 mM-Solubilisat" (2,5 mg Protein; 1,2 ml) wurde, abhängig von der während der Rekonstitution gewählten Detergenzkonzentration entweder direkt mit dem ^{14}C -Phytoen-Lipidfilm, der nach Abblasen des Lösungsmittels entstanden war, inkubiert (Rekonstitution: 10 mM CHAPS) oder die in Puffer dispergierten ^{14}C -Phytoen-Liposomen (1,08 ml) wurden mit dem "10 mM-Solubilisat" schnell gemischt (Rek.: 5,3 mM CHAPS).

Die Insertion der solubilisierten Proteine in die ^{14}C -Phytoen-Lipidvesikeln erfolgte schließlich je nach der gewählten Rekonstitutionstechnik unter Einbeziehung eines Freeze-thaw-Zyklus (Freeze-thaw-Technik) oder durch verlängerte Ultraschallbehandlungen (Sonifiertechnik) (vgl. Abschnitt II.2.6.).

Um die Wirkung einer Rekonstitution auf die solubilisierten Enzymaktivitäten zu prüfen, wurde in einem weiteren Inkubationsansatz 1,2 ml "10 mM-Solubilisat" als Enzymquelle

eingesetzt, das lipophile Substrat wurde durch Ultraschallbehandlung (2x15 sec) in Puffer dispergiert und dem Inkubationsansatz zugegeben, ohne Zusatz von exogenen Lipiden. Der in-vitro Test wurde bei einer CHAPS-Konzentration von 1,3-1,6 mM CHAPS 16 h lang durchgeführt.

Die Ergebnisse (Tab. 9) zeigen, daß nach Solubilisierung trotz Lipid-Rekonstitution die Aktivität aller an der Phytoen-metabolisierung beteiligten Enzyme drastisch reduziert ist. Während die membrangebundenen Isomerase(n), Dehydrogenase(n) und Cyclase(n) bis zu 42 % des angebotenen Substrates in die ungesättigteren Carotinoide umsetzen können, erreichen die solubilisierten Enzyme nur einen Umsatz von 6,8-7,5 %, unabhängig davon, ob die Solubilisierung der integralen Membranproteine mit 10 oder mit 75 mmol/l CHAPS versucht wurde. Dieser Aktivitätsverlust nach Solubilisierung wird noch verstärkt, wenn die Rekonstitution der solubilisierten Enzyme nach der Freeze-thaw-Technik durchgeführt wurde. Des weiteren konnte ein eindeutiges Rekonstitutionsbedürfnis der solubilisierten Enzyme nachgewiesen werden; ohne Lipidaktivierung lag die Umsetzungsrate von ^{14}C -Phytoen bei nur 1 %.

Auf dem Carotinoidbiosyntheseweg ausgehend von Phytoen konnten Neurosporin, Lycopin, γ -Carotin und 3,4-Dehydrolycopin als Produkte identifiziert werden. Vergleichbare Resultate erbrachten auch Inkubationsansätze mit den membrangebundenen Enzymen.

Die Isomerase-, Dehydrogenase- und Cyclase-Aktivität kann also durch 10 bzw. 75 mmol/l CHAPS von der Membran gelöst werden. Aussagen darüber, ob die einzelnen Enzyme ähnlich wie bei *Narcissus* (Beyer et al., 1985) bei der Rekonstitution in einem Liposom vorliegen, oder ob die einzelnen Enzyme mit einer gewissen Kooperativität arbeiten sind auf Grund dieser Ergebnisse nicht möglich.

Tabelle 9:

Umsetzung von ^{14}C -Phytoen (in %) durch die membranengebundenen bzw. solubilisierten Enzyme ("10 mM und 75 mM-Solubilisat"= Sol.). (Mittelwerte aus 3 Versuchen). 2,5 mg Protein wurden durch Sonifier- (S) bzw. Freeze-thaw- (F.t.) Technik in ^{14}C -Phytoen-Liposomen (6,5 bzw. 8 mg Lipide und 535 000 cpm ^{14}C -Phytoen) inkorporiert. Rekonstitution (Rek.) bei verschiedenen CHAPS-Konz. (5,3 und 10 mM). Enzymtest: 1,6 mM CHAPS; 16 h. Abkürzungen siehe Tabelle 3.

Fraktion + Bedingungen	Einbau von Radioaktivität (%) in:				
	Phytoen	unges. Carot. gesamt	einzelne unges. Carotinoide		Nsp. x. + n. ident. Prod.
			Neurosp. γ -Car.	Lycopin	3,4-D.
Membranfrkt.	37,8	42,7	6,1	9,0	21,7
"10 mM-Sol."					
Rek.: -	94,4	1,1	0,5	0,3	0,1
5,3 mM; F.t.	91,0	3,9	1,3	0,6	0,2
5,3 mM; S.	86,7	7,5	2,3	2,0	1,5
10 mM; S.	87,7	6,8	2,3	2,0	2,1
				1,1	1,3
					4,2
					4,8
					5,5
					5,4
"75 mM-Sol."					
Rek.: -					
10 mM; F.t.	91,7	4,4	1,3	1,3	0,8
10 mM; S.	89,6	6,1	1,8	1,9	1,1
					1,0
					1,4
					3,8
					3,7

2. Lichtinduzierte Änderungen von in-vitro und in-vivo translatierten Proteinen im Zusammenhang mit der Carotinoidbiosynthese

Wie bei einigen anderen Pilzen, so steht auch bei *Neurospora crassa* die Carotinoidbiosynthese unter strikter Photo-
kontrolle. Während im Dunkeln gehaltenes Myzel nur wenig
Farbstoff synthetisiert, kommt es nach einer Blaulicht-
induktion zu einem drastischen Anstieg der Carotinoidmenge.
Wie in der Einleitung bereits ausführlich dargestellt, konnte
aus allen bisherigen Untersuchungen der Schluß gezogen werden,
daß nach Lichtinduktion über eine differentielle Gen-
derepression spezifische m-RNAs auftreten und schließlich die
carotinoidbildenden Enzyme de novo synthetisiert werden.
Um einen direkten Nachweis einer de novo Synthese von
Proteinen via Genderepression näher zu kommen, wurden licht-
induzierte Änderungen auf der Ebene der m-RNAs und auf der
Ebene der Membranproteine auf ihre Korrelation mit der
Carotinoidbiosynthese hin untersucht.

Gegenüber früheren derartigen Untersuchungen (Mitzka-Schnabel
et al., 1984) wurden die Versuchsbedingungen dahingehend
optimiert, daß andere lichtinduzierte Prozesse weitgehend aus-
zuschließen sind. Es wurde deshalb statt Weißlicht Blaulicht
für die Photoinduktion der Carotinoidbiosynthese verwendet;
die Photoinduktionsphase wurde auf eine Minute reduziert, ein
Lichtimpuls, der einerseits kurz genug ist um andere
lichtinduzierte Vorgänge weitgehend auszuschließen, der
andererseits jedoch für eine Induktion der Carotinoid-
biosynthese bei *Neurospora* ausreichend ist (Schrott, 1980). In
früheren Untersuchungen über lichtbedingte Veränderungen im
Polypeptidmuster im Zusammenhang mit der Pigmentbildung er-
folgte eine Dauerbelichtung mit Weißlicht (60 W/m^2) über
10 Minuten und länger. Bei diesen verlängerten Belichtungs-
zeiten konnte nicht ausgeschlossen werden, daß die durch die
Photoinduktion eingeleiteten Folgeprozesse über die gesamte
Belichtungszeit hinweg immer wieder beginnen und es somit zu
einer Überschneidung der Proteinbildungsprozesse kam. Bei der

Wahl der Nachreaktionszeiten nach erfolgter Blaulichtinduktion wurden Kriterien der Carotinoidbiosynthese zugrunde gelegt, die im Rahmen von Inhibitorstudien (Rau, 1980) und Akkumulationskinetiken hinsichtlich von lag-Phase und Auftreten der ersten Carotinoide gewonnen wurden.

2.1. Wirkung der Photoinduktion der Carotinoidbiosynthese auf m-RNAs

Der de novo Synthese der photoinduzierten Enzymproteine für die Carotinoidbiosynthese ist die Transkription und das Processing der entsprechenden Genprodukte vorgeschaltet. Um die nach Lichtinduktion der Carotinoidbiosynthese auftretenden Veränderungen auf RNA-Ebene näher zu untersuchen, wurde m-RNA aus belichtetem und unbelichtetem Myzel isoliert. Nach Umsetzung ihrer Translationskapazität in einem in-vitro Translationssystem wurden dann stadienspezifische licht-induzierte Aktivitätsänderungen einzelner m-RNA-Spezies anhand der Intensitätsänderungen der zugehörigen Polypeptide auf den Fluorogrammen bestimmt.

2.1.1. Versuchsdurchführung

Bis zur Belichtung wurde das 20 h alte Pilzmyzel wie in Abschnitt II.2.1. beschrieben vorbereitet. Die Dunkelkontrollen wurden sofort im Anschluß an die 2-stündige Akkommodationsphase abgebrochen. Um lichtbedingte Änderungen in der RNA-Synthese zu erfassen, wurde das Pilzmyzel 1 min. mit Blaulicht unter O_2 -Zufuhr induziert (Belichtungsbedingungen siehe Abschnitt II.2.1.) und nach verschiedenen Nachreaktionszeiten (4-9-14-29-59 min. bzw. 6 h) abgebrochen. Da für die RNA-Extraktion mindestens 2,5 g Frischgewicht nötig sind, wurden die Myzelsuspensionen aus jeweils 3 Waschflaschen für eine Probe vereinigt.

Das Pilzmyzel wurde über einen Büchnertrichter (Filter 604, Schleicher & Schüll) abfiltriert, mit Wasser nachgewaschen,

das fast trockene Myzel nach Bestimmung des Frischgewichts in Alufolie sofort in flüssigem N_2 tiefgefroren und bei $-60^\circ C$ bis zur RNA-Extraktion aufbewahrt.

Kontrollproben zur Bestimmung der gebildeten Carotinoide wurden nach Belichtung zur Nachreaktion wieder an den Luftstrom angeschlossen und nach 6 h die Pigmentmenge bestimmt (Extraktion und Bestimmung der Gesamtcarotinoidmenge s. Seigner, L., 1984, s. Abschnitt II.3.).

Eine 1-minütige Blaubelichtung führte bei *Neurospora* zur Synthese von ca. 100 μg Carotinoide/g Trockengewicht.

2.1.2. Nachweis lichtinduzierter Aktivitätsänderungen einzelner m-RNAs

Die Extraktion der Nukleinsäuren aus den jeweiligen Myzelproben (4-5 g Frischgewicht) erfolgte nach der sog. "SDS-Proteinase K-Methode" von Hall, 1978 (s. Abschnitt II.3.1.). Aus den RNA-Präparationen wurde die Poly A⁺-haltige RNA durch Affinitätschromatographie an Oligo-dT-Cellulose (Aviv and Leder, 1972) angereichert (s. Abschnitt II.3.2.) und 1 μg dieser stadienspezifischen m-RNAs anschließend im zellfreien System aus Kaninchenreticulozytenlysat translatiert (Abschnitt II.3.3.).

Die Ausbeute an isolierter Gesamt-RNA und Poly A⁺-RNA zu verschiedenen Zeiten nach Lichtinduktion, sowie die Translationsaktivität der jeweiligen Poly A⁺-RNAs ist in Tabelle 10 zusammengefaßt. Die Translationsaktivitäten der zu den jeweiligen Zeitpunkten isolierten m-RNAs wurde an Hand der Einbauraten von ^{35}S -Methionin in die säurefällbaren Translationsprodukte im Szintillationszähler bestimmt und in Relation gesetzt zum endogenen Einbau, der durch die im Retikulozytenlysat vorhandene m-RNA bedingt wird.

Die in Tabelle 10 zusammengefaßten Einzelergebnisse lassen erkennen, daß Belichtung weder eine Erhöhung der Poly A⁺-Menge noch eine deutliche Steigerung der Translationsaktivität induziert.

Tabelle 10:

Zusammenfassung der Einzelergebnisse der RNA-Isolierung. (Mittelwerte aus 6 Versuchen). Angegeben sind die Gesamt-RNA- und Poly A⁺-RNA-Mengen bezogen auf das Frischgewicht (FGW) des Probenmyzels, die Ausbeute an Poly A⁺-RNA und ihre Translationsaktivität im in-vitro Translationssystem (gemessen am Einbau von ³⁵S-Methionin in TCA-fällbares Material; 1 µg Poly A⁺-RNA pro 25 µl Reaktionsgemisch; 1 h Inkubation).

Zeit n. Bel.- Beginn (min)	Gesamt-RNA (mg/g FGW)	Poly A ⁺ -RNA (µg/g FGW)	Poly A ⁺ -RNA (% Gesamt-RNA)	³⁵ S-Einbau (cpm10 ⁴ /µg RNA)	Vielfaches des Endogenen
0	2,99	13,9	4,8	104,5	3,4
10	3,43	14,4	4,6	124,0	4,0
15	3,35	13,3	4,0	121,8	3,9
30	3,45	15,9	4,7	104,0	3,4
60	2,97	12,3	4,3	106,0	3,5

Die in-vitro synthetisierten und dabei radioaktiv markierten Proteine wurden durch 2-dimensionale Gelelektrophorese nach O'Farrell aufgetrennt (s. Abschnitt II.3.4.1.).

Die nachfolgenden Bilder von Fluorogrammen zeigen die in-vitro Translationsprodukte von Poly A⁺-RNA, die vor und zu verschiedenen Zeiten nach Lichtinduktion isoliert wurden (Abb. 13).

Während die endogene m-RNA des Retikulozytenlysats nur zur Bildung eines markierten Polypeptids führt (Christofferson et al., 1982), zeigt sich nach Zugabe von m-RNA, die aus *Neurospora* gewonnen wurde, ein differenziertes

Polypeptidmuster mit ungefähr 330-350 Spots nach 2-dimensionaler Auftrennung und nachfolgender Fluorographie.

Ein Vergleich der Polypeptidmuster zeigt zunächst, daß nach Lichtinduktion keine Polypeptide verschwinden, vielmehr erscheinen 9 Polypeptidspots verstärkt. Ein Vergleich von Bildreihen aus verschiedenen Versuchen ließ trotz gewisser Schwankungen eine gute Reproduzierbarkeit der Spots in Anzahl und Muster erkennen. Die erhaltenen Polypeptidmuster zeigen auch eine zufriedenstellende Übereinstimmung mit früheren Versuchen (Mitzka-Schnabel et al., 1984). In die folgende Darstellung wurden aber nur solche Veränderungen aufgenommen, die bei allen Versuchen mit ausreichender Deutlichkeit auftraten. Auf Grund von Ergebnissen von Inhibitorstudien, m-RNA-Markierungsversuchen und Akkumulationskinetiken an den Pilzen *Fusarium aquaeductuum* und *Neurospora crassa* kann geschlossen werden, daß die Gene, die für die carotinoidbildenden Enzyme codieren, bei *Neurospora* im wesentlichen innerhalb der ersten 30 Minuten nach Lichtinduktion transkribiert sein dürften. Durch diese zeitliche Eingrenzung der Transkriptionsprozesse, die für die Carotinoidsynthese entscheidend sind, sollte die Korrelation einzelner m-RNA-Spezies und ihrer Translationsprodukte mit der Carotinoidsynthese erleichtert werden. Bei der Abschätzung der Intensitätsunterschiede einzelner Polypeptidspots per Auge besteht das Problem, daß die Gesamtschwarzung der Polypeptide und die Hintergrundsschwarzung der Fluorogramme auf den entsprechenden Photos sehr

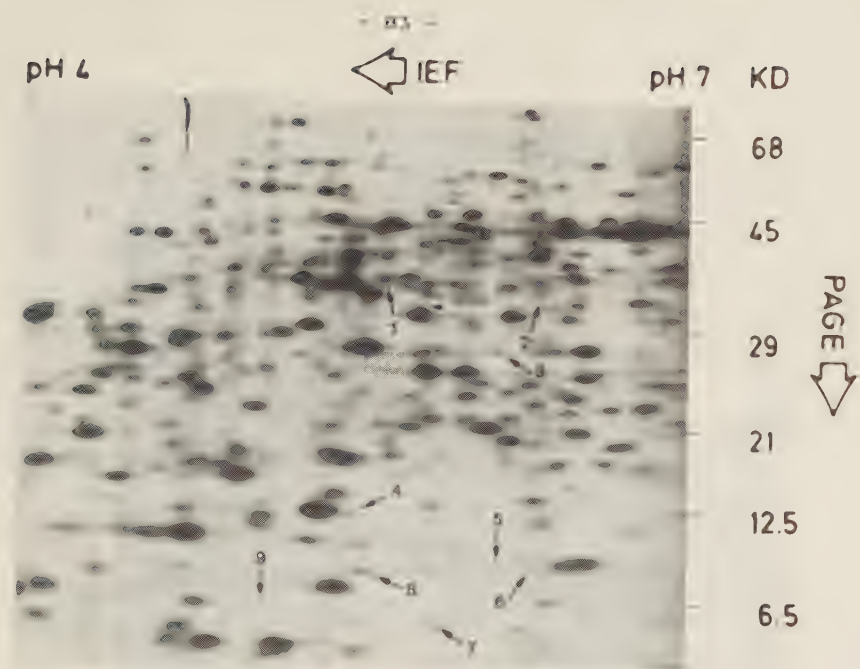


Abb. 13 a: Dunkelkontrolle

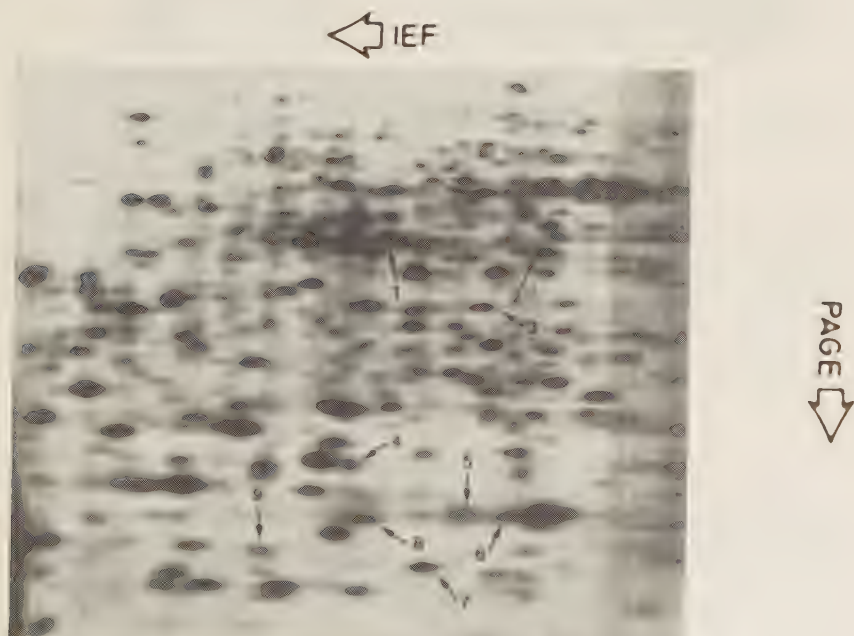


Abb. 13 b: 1 min. Blaulicht + 15 min. Nachreaktionszeit

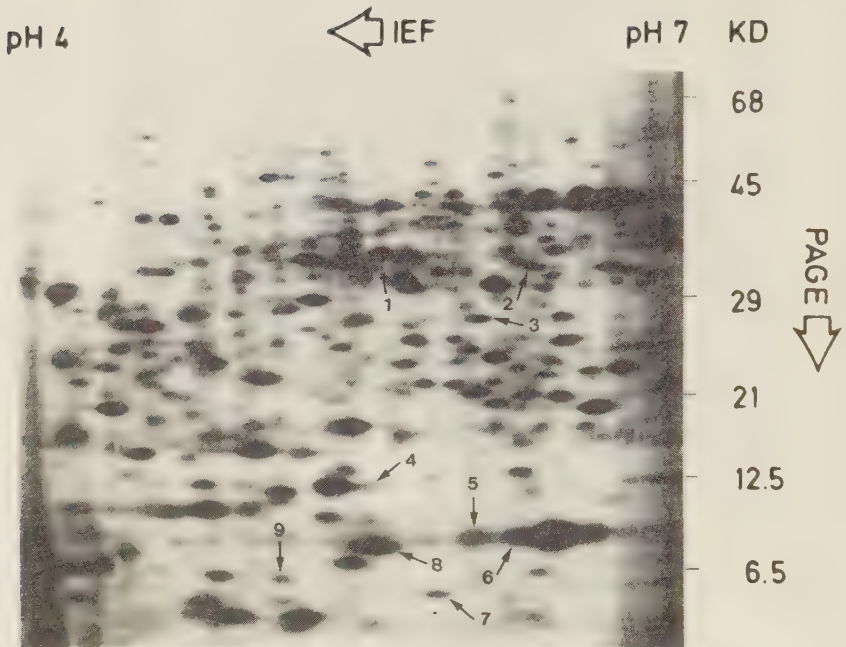


Abb. 13 c: 1 min. Blaulicht + 30 min. Nachreaktionszeit

Abb. 13 a-c:

Fluorographische Darstellung ^{35}S -markierter in-vitro Translationsprodukte nach 2-dimensionaler Gelelektrophorese. Die Synthese der radioaktiv markierten Polypeptide erfolgte in Gegenwart von m-RNA, die aus unbelichtetem (a) und belichtetem Myzel 15 min. (b) bzw. 30 min. (c) nach Lichtinduktion (1 Minute Blaulicht) isoliert worden waren. Die Pfeile markieren in-vitro translatierte Polypeptide, deren Intensität sich nach Photoinduktion verändert.

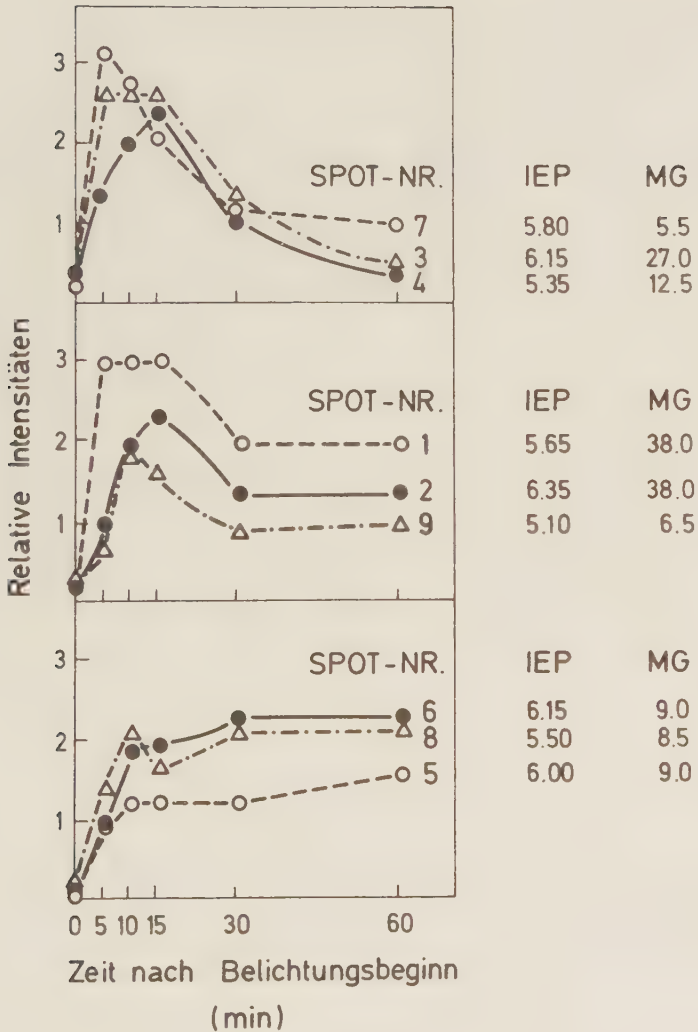


Abb. 14:

Graphische Darstellung der lichtbedingten Intensitätsänderungen von Polypeptiden in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Isolierung der zugehörigen m-RNAs. Die Nummerierung der Spots bezieht sich auf die in Abb. 13 gewählte Bezeichnung der Polypeptide. Für jeden Spot ist noch das Molekulargewicht (MG in kDalton) und der isoelektrische Punkt (IEP) angegeben.

unterschiedlich war; dies wurde bei der Beurteilung der Intensitätsänderungen der Spots so gut wie möglich berücksichtigt.

Die Intensitätsänderungen der relevanten Polypeptide sind in Abb. 14 dargestellt. Dabei werden auch Molekulargewicht und Isoelektrischer Punkt der diskutierten Polypeptide angegeben. Die Abschätzung der Molekulargewichte erfolgte unter Einbeziehung des Auftrennungsverhaltens von Molekulargewichtsmarkern von Serva. Die pH-Messung in den Gelen nach der isoelektrischen Fokussierung erfolgte mit einer Mikro-pH-Elektrode.

Alle 9 Polypeptidspots lassen im Dunkeln geringe Intensität erkennen. Auf Grund ihres Verhaltens nach Lichtinduktion lassen sich die Polypeptide in 3 Gruppen einteilen: Die Polypeptide 3, 4 und 7 zeigen bei geringer Anfangsintensität nach Lichtinduktion rasche Intensitätsanstiege, gefolgt von einem schnellen Abfall. Ähnlich verhalten sich die Polypeptide 1, 2 und 9, der Intensitätsabfall ist jedoch geringer. Auch bei den Polypeptiden 5, 6 und 8 ist die Anfangsintensität gering und der Anstieg nach Belichtung erfolgt rasch; es folgt jedoch kein Intensitätsabfall.

2.2. Die Wirkung der Photoinduktion der Carotinoidbiosynthese auf Membranproteine

Nachdem nach Photoinduktion der Carotinoidbiosynthese spezifische lichtinduzierte m-RNAs an Hand ihrer Translationsprodukte nachgewiesen werden konnten, sollte nun geprüft werden, ob durch Belichtung auch Membranproteine neu oder verstärkt auftreten.

Die lichtbedingten Veränderungen wurden deshalb auf den Bereich der Membranproteine eingegrenzt, weil diese den Hauptanteil (80 %) der carotinoidbildenden Enzymaktivitäten darstellen (Mitzka-Schnabel und Rau, 1981) und damit eine Korrelation solcher Proteine mit den Enzymen der Carotinoidsynthese erleichtert wird. Dazu wurden ^{35}S -Puls-markierte und

in-vivo translatierte Membranproteine zu verschiedenen Zeiten nach einem 1-minütigen Blaulichtimpuls wie auch aus im Dunkeln gehaltenem Pilzmyzel isoliert. Nachfolgend sollte dann ein Vergleich der über Gelelektrophorese aufgetrennten Membranproteine lichtbedingte Veränderungen im Polypeptidmuster in Abhängigkeit von der jeweiligen Nachreaktionszeit nach Lichtinduktion erkennen lassen.

An Hand der Kinetik der nach Belichtung neu oder verstärkt auftretenden Polypeptide sollte es möglich sein, bestimmte Polypeptide in Korrelation mit der Carotinoidsynthese zu bringen.

2.2.1. Versuchsdurchführung

Das 20 Stunden alte Myzel wurde bis zur 2-stündigen Akkommodationsphase wie unter Abschnitt II.1. und II.2.1. beschrieben angezogen und in Gaswaschflaschen für die nachfolgende Belichtung vorbereitet. Dazu wurden 40 ml Pilzsuspension (etwa 1 g Trockengewicht) gemeinsam mit 40 ml Puffer-Glucose-Lösung (Endkonz.: 16 mM KH_2PO_4 und 2 % (w/v) Glucose) in 250 ml Waschflaschen pipettiert. Während der Akkommodationsphase wurde nach 90 min. kaltes L-Methionin in einer Endkonzentration von $6,6 \times 10^{-6}$ mol/l den Gaswaschflaschen zugegeben.

Für die 1-minütige Induktionsphase mit Blaulicht (16 Watt/m²) wurden die Waschflaschen zwischen 2 Blaulichtaggregate gestellt und mit Sauerstoff versorgt. Die genauen Angaben dazu sind unter Abschnitt II.2.1. nachzulesen. Gleichzeitig mit Belichtungsbeginn wurden 25 μCi L-³⁵S-Methionin (Amersham, Braunschweig) den Pilzsuspensionen zugesetzt. Um eine Kinetik der lichtinduzierten ³⁵S-markierten Proteine zu erstellen, wurden die Proben nach einheitlichem Blaulichtimpuls verschieden lang (5-15-30-60-120 Minuten) im Dunkeln in Gegenwart von Sauerstoff weiterinkubiert. Parallel dazu wurden Dunkelkontrollen zu jedem Zeitpunkt der Kinetik mitgeführt. Um eine Substratlimitierung auszuschließen wurde den 120-Minuten-Werten nach der Hälfte der Nachreaktionszeit

(60 min.) nochmals heißes und kaltes Methionin zugegeben. Durch die Zugabe von Cycloheximid in einer Endkonzentration von $3,5 \times 10^{-4}$ mol/l wurde schließlich der Aminosäureeinbau in die Proteine sofort gestoppt (Neupert, 1983); so konnten definierte Perioden radioaktiver Markierung realisiert werden. Danach wurden aus jeder Waschflasche 1 ml-Aliquots zur Bestimmung des ^{35}S -Methionineinbaus entnommen. Die Bestimmung des Einbaus von radioaktiv markierten Aminosäuren erfolgte nach Huber-Willer (1982). Dazu wurden diese 1 ml-Aliquots sofort in 1 ml 20 % (w/v) eisgekühlter TCA (Roth, Karlsruhe) suspendiert und 20 sec. lang kräftig "gewhirlt" (Supermixer, Lab-Line Instruments Inc.). Nach 5 min. wurde dieses TCA-Pilzgemisch mit einer Metallfritte über Whatman GFC ($\varnothing$ 2,4 cm) abgenutscht, mit 5 ml 10 %-iger (w/v) TCA und 5 ml 70 %-igem (v/v) Ethanol nachgespült. Für die Bestimmung der eingebauten Radioaktivität wurden die trockenen Myzelplättchen in 5 ml Toluol-Butyl-PBD (7 g/l; Zinsser) eingelegt und im Szintillationszähler (Contron) gezählt. Das Pilzmyzel der Dunkel- bzw. Lichtproben wurde dann über eine Porzellanfritte abfiltriert und mit 10 ml eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol und 20-30 ml eiskaltem Wasser gewaschen. Die Myzelpads wurden dann nach der Frischgewichtsbestimmung bis zur Gewinnung der Membranproteine bei -60°C eingefroren. Die membrangebundenen ^{35}S -pulsmarkierten Proteine wurden nach der in Abschnitt II.3.5. dargestellten Methode aus den Myzelpads extrahiert und durch differentielle Zentrifugation von der löslichen Proteinfraktion (115 KS) abgetrennt. Daraufhin wurden aus der Membranfraktion (115 KP) 3-5 μl Aliquots entnommen und so der Einbau an radioaktivem Methionin bestimmt.

2.2.2. Lichtbedingte Veränderungen in der Zusammensetzung der Membranproteine

Die Ergebnisse der ^{35}S -Puls-Markierungsversuche sind in Abb. 15 zusammengestellt. Wie die graphische Darstellung erkennen läßt, ist der Einbau der angebotenen ^{35}S -markierten

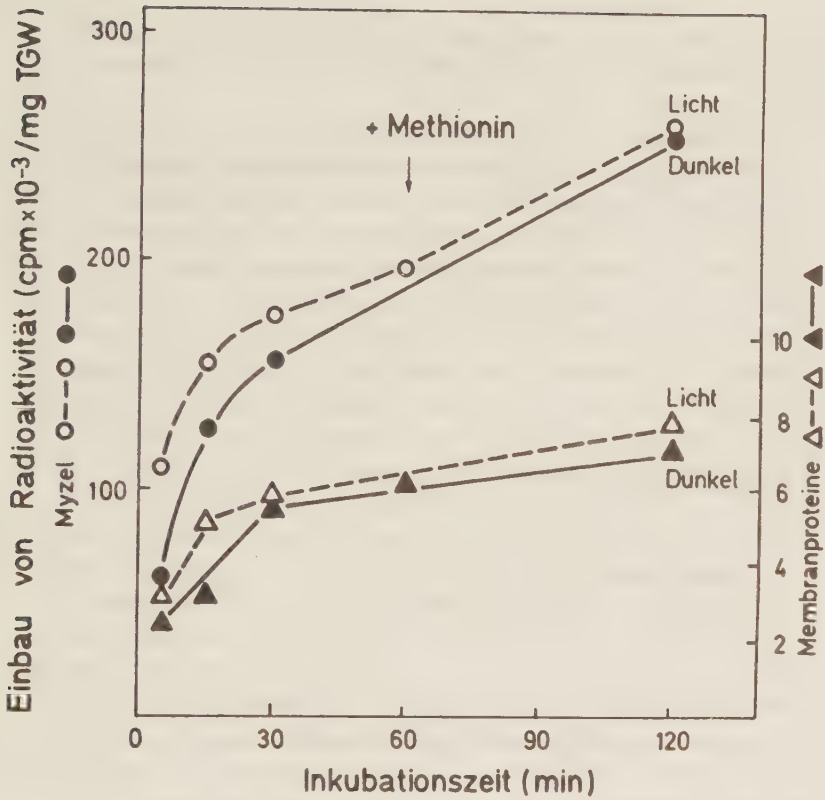


Abb. 15:

Einbau von ^{35}S -Methionin in das Myzel und in die Membranproteine in Abhängigkeit von der Inkubationszeit nach Photoinduktion [1 min. Blaulicht] (o; Δ) bzw. im Dunkeln ($\bullet$; $\blacktriangle$). (Mittelwerte aus 2 Versuchen).

Nach 60 Minuten erfolgte eine erneute Zugabe von markiertem und unmarkiertem Methionin.

Aminosäure nach der 1-minütigen Blaulichtinduktion gegenüber dem der Dunkelkontrollen über die gesamte Inkubationszeit etwas gesteigert.

Da nach der gewählten kurzen Belichtungszeit (1 min.) andere lichtabhängige Prozesse außer der Carotinoidbiosynthese weitgehend ausgeschlossen werden können, sollte es möglich sein, bestimmte nach Lichtinduktion neu oder verstärkt auftretende Polypeptidspots nach elektrophoretischer Auftrennung an Hand ihrer Kinetik mit der Farbstoffsynthese in Korrelation zu setzen.

Dazu wurden die ^{35}S -Puls-markierten Membranproteine mittels 2-dimensionaler Gelelektrophorese nach O'Farrell, 1975 (s. Abschnitt II.3.4. und II.3.6.) aufgetrennt. Um eine gute Auflösung der einzelnen radioaktiv markierten Spots zu gewährleisten, wurden nicht mehr als 700 000–1 000 000 cpm pro Gelwürstchen bei der Isoelektrischen Fokussierung eingesetzt. Für die Bestimmung der Radioaktivität der in Lysispuffer A* überführten Membranproteine wurde von 3–5 μl Aliquots die Radioaktivität in 10 ml Szintillationsflüssigkeit von Packard (Insta-Gel) gemessen.

Ein Vergleich der Polypeptidmuster von belichteten und im Dunkeln gehaltenen Proben ließ erkennen, daß nach der 1-minütigen Blaulichtbelichtung vier Polypeptidspots in ihrer Intensität zunehmen. Diese 4 Polypeptide weisen folgende Molekulargewichte bzw. Isoelektrische Punkte auf: Spot Nr. 1: 46,5 kD, IEP: 6,80; Spot Nr. 2: 43 kD, IEP: 6,75; Spot Nr. 3: 27 kD, IEP: 6,15; Spot Nr. 4: 12,5 kD, IEP: 5,35.

Auf Grund des zeitlichen Verlaufs der Zunahme ihrer Intensitäten lassen sich jedoch diese 4 nach Belichtung verstärkt auftretenden Polypeptide in keinen direkten Zusammenhang mit der Carotinoidbiosynthese stellen.

IV. DISKUSSION

Die Hypothese, daß nach Photoinduktion die carotinoid-synthetisierenden Enzyme wahrscheinlich de novo über eine differentielle Genaktivierung und Bildung spezifischer messenger-RNAs synthetisiert werden, konnte bereits durch viele Befunde in früheren Untersuchungen unterstützt werden (Rau et al., 1968; Bindl et al., 1972; Jochum, 1977; Schrott und Rau, 1977; Mitzka-Schnabel und Rau, 1981; Mitzka-Schnabel et al., 1984). Der direkte Nachweis, daß Photoregulation nach diesem Mechanismus abläuft, konnte bei *Neurospora* bislang nicht geführt werden, weil die Enzyme nicht isoliert und damit die Voraussetzungen für die Bildung von spezifischen Antikörpern nicht gegeben sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die lichtinduzierten Enzyme der Carotinoidbiosynthese von *Neurospora crassa* untersucht; im Mittelpunkt standen dabei Versuche zur Solubilisierung der Phytoensynthase und der Phytoen-metabolisierenden Enzyme, sowie die Rekonstitution ihrer enzymatischen Aktivität. Damit sollte die Basis geschaffen werden, um das erste Mal bei einem eukaryontischen Organismus diejenigen Enzyme anzureichern und zu charakterisieren, die einer strikten Photoregulation unterliegen. Damit wären die Voraussetzungen für immunologische Nachweistechiken erfüllt. Da es bislang noch nicht möglich ist, lichtinduzierte aktive m-RNA für diese Enzyme an Hand ihrer Antikörper zu identifizieren, wurden als Annäherung an die genannte Problemstellung Kinetiken von lichtinduzierten Veränderungen auf der Ebene der m-RNA und der Membranproteine erstellt, die eine Korrelation der durch Licht verstärkt auftretenden in-vitro und in-vivo translatierten Proteine mit der Carotinoidbiosynthese ermöglichen sollten.

Optimierung der membrangebundenen Enzyme

Zunächst sollte die in-vitro Syntheseleistung der membrange-

bundenen carotinoidsynthetisierenden Enzyme, wie der Phytoensynthase und der Phytoen-metabolisierenden Enzyme optimiert werden. Die optimierten Bedingungen sollten es dann erlauben, auch bei solubilisierten Enzymen, deren Aktivität oftmals durch fehlendes oder gestörtes Lipidmilieu vermindert ist, die Carotinoidsynthesefähigkeit im in-vitro Test zu erfassen.

Im kombinierten in-vitro Test mit ^{14}C -MVA gelang es durch eine gleichzeitig beginnende Inkubation beider Enzymsysteme, des GGPP-bildenden Kürbissystems mit den carotinoid-synthetisierenden Membranproteinen von Neurospora, die Konkurrenzreaktion um das gemeinsame Substrat GGPP so umzusteuern, daß GGPP vorwiegend in den Carotinoidbiosyntheseweg eingeschleußt wird (Tab. 1) und nur zu einem geringen Teil für die Kaurenbildung durch die Enzyme des Kürbisendosperms abgezogen wird. Die in-vitro Carotinoidsynthese kann so im Vergleich zu den früheren Inkubationen, bei denen dem eigentlichen Enzymtest eine 2,5-stündigen Vorinkubationsphase mit dem Kürbissystem alleine vorgeschaltet war, um das 3,6-fache gesteigert werden.

Tab. 2 und Abb. 3 zeigen, daß Inkubationszeiten bis zu zwei Stunden für die in-vitro Carotinoidsynthese optimal sind. Bei längeren Inkubationszeiten erscheint das Neurospora-System im Hinblick auf die GGPP-Metabolisierung dem kaurenbildenden Kürbissystem immer stärker unterlegen zu sein.

Ursache für diesen Aktivitätsverlust könnten spezifische Neurospora-eigene Proteasen sein, wie sie von Gaertner (1976) näher untersucht wurden. Die proteolytische Aktivität dieser Proteasen könnte sich möglicherweise besonders auf Neurospora-Proteine auswirken.

Die Ergebnisse in Tab. 1 und 2 verdeutlichen, daß die in-vitro Aktivität der Enzyme, die Phytoen weiter zu den ungesättigten Carotinoiden umsetzen, im kombinierten Testsystem sehr gering ist. Da bis zu 73 % der eingebauten Radioaktivität im Phytoen vorlag, kann eine Substratlimitierung als mögliche Ursache für die geringe Phytoenumsetzung ausgeschlossen werden.

Mit ^{14}C -Phytoen, das in Form von Liposomen den membrangebunden Enzymen als direktes Substrat angeboten wird, kann die Synthese der ungesättigten Carotinoide von der GGPP- und Phytoenbildung entkoppelt werden. Nur dadurch ist es möglich, speziell auf das Cofaktorenrequirement der Phytoen-metabolisierenden Enzyme einzugehen, um damit die in-vitro Syntheseaktivität dieser Enzyme entscheidend zu steigern. So wurde ein Cofaktorenangebot erarbeitet, das ATP (3,75 mM), NADP (2 mM), FAD (0,02 mM), MgCl_2 (10 mM) und MnCl_2 (1 mM) enthielt (Tab. 3); dieses Angebot führte im Vergleich zu der Cofaktorenkombination wie sie im kombinierten Testsystem vorliegt zu einer 8-fachen Steigerung der in-vitro Carotinoid-synthese ausgehend von ^{14}C -Phytoen (Abb. 4; Tab. 3). Studien an einem System aus Tomatenfruchtplastiden (Kushwaha et al., 1970; Qureshi et al., 1972; s. Porter et al., 1979) hatten ähnliche Cofaktorenbedürfnisse ergeben. Demnach ist die Umsetzung von Phytoen zu Phytofluene NADP abhängig, während für die nachfolgenden Reaktionen bis zum Lycopin FAD und Mn^{2+} notwendig sind. FAD sollte desweiteren auch für die Bildung von cyclischen Carotinoiden nötig sein (Porter et al., 1977). Auch bei der Umsetzung von trans-Phytoen durch ein lösliches Enzymsystem von *Halobacterium cutirubrum* (Kushwaha et al., 1976) konnte eine stimulierende Wirkung von FAD und NADP festgestellt werden. Diese Erkenntnisse wurden weiterhin durch Cofaktorstudien bei den Pilzen *Phycomyces blakesleeana* (Clark et al., 1981) und *Aspergillus giganteus* (El-Jack et al., 1988) bestätigt. In Gegenwart von NADP, FAD, Mn^{2+} und Mg^{2+} konnten schließlich aus der Chromoplastenmembran solubilisierete und in Liposomen rekonstituierte Enzyme angebotenes Phytoen zu etwa 70 % in β -Carotin umsetzen (Beyer et al., 1985). Diese Cofaktorenkombination erwies sich auch im Hinblick auf eine hohe enzymatische Aktivität einer aus dem Chromoplasten von *Capsicum* solubilisierten Lycopincyclase (Camara et al., 1986) als effektiv.

In Übereinstimmung mit diesen Literaturdaten sind also auch bei *Neurospora* NADP, FAD, Mg^{2+} und Mn^{2+} für die Phytoen-umsetzung notwendig oder wirken zumindest stimulierend.

Zusätzlich konnte die stimulierende Wirkung von ATP eindeutig aufgezeigt werden.

Eine Metabolisierung von Phytoen, das ein wasserunlösliches Substrat darstellt, findet dabei bevorzugt in lipophiler Umgebung, in sog. Liposomen statt (Abb. 5). Wird hingegen das durch Sonifizieren dispergierte Substrat ohne exogene Lipide den membrangebundenen Enzymen angeboten, ist ihre Aktivität deutlich geringer. Eine hohe ^{14}C -Markierung der ungesättigten Carotinoide wurde durch Zugabe von etwa 1 mmol/l Membranlipiden erreicht.

Die aktivitätssteigernde Wirkung der Lipide auf die Phytoen-metabolisierenden Enzyme, die an der Synthese der ungesättigten Carotinoide beteiligt sind, ist noch vollständig ungeklärt. Der steigernde Effekt könnte dabei z.T. auf einer Solubilisierung des wasserunlöslichen Substrates beruhen, wodurch die Interaktionen zwischen hydrophobem Substrat und Enzym erleichtert werden bzw. bei einem Überschuß an Lipiden könnte dann der aufgezeigte gegenteilige Effekt erklärt werden. Andererseits kann durch die Ultraschallbehandlung, wodurch ein enger Kontakt zwischen den ^{14}C -Phytoen-Liposomen und den Enzymen hergestellt werden sollte, eine gewisse Desintegration der Enzyme aus der Membran nicht ausgeschlossen werden. Dadurch könnten die exogenen Lipide mit den gelösten Proteinen in direkten Kontakt treten und als allosterische Effektoren fungieren (Freedman, 1981; Bohnenberg et al., 1983). Eine gesteigerte Kooperativität zwischen den einzelnen Enzymen bzw. Enzymkomponenten durch exogene Lipide kann ebensowenig ausgeschlossen werden.

Unter optimalen Cofaktor- und Lipidbedingungen werden etwa 43 % des angebotenen Phytoens in die ungesättigten Carotinoide umgesetzt. Ein Vergleich mit der in-vivo Carotinoidbiosynthese von *Neurospora* (Mitzka und Rau, 1977), wobei 54 % der Gesamtcarotinoide auf der Stufe des Phytoens auf dem Biosyntheseweg ausgeschleußt werden, läßt deutlich erkennen, daß unter den erarbeiteten Bedingungen die in-vitro Phytoenmetabolisierung optimal ist. Obwohl eine Analyse darüber fehlt, wieviel cis- bzw. trans-Phytoen unter in-vitro

Bedingungen von den Neurospora-Membranproteinen synthetisiert wird und auch keine Aufreinigung des Isomerengemisches durchgeführt wurde, so kann doch auf Grund von in-vivo Befunden (Mitzka-Schnabel und Rau, 1981) angenommen werden, daß vor allem cis-Phytoen eingesetzt wurde. Da nur wenig Neurospora-xanthin gebildet wird und der größte Teil des Phytoens nur bis zu den acyclischen Carotinoiden Lycopin und 3,4-Dehydrolycopin umgesetzt wird, wird daher angenommen, daß diese Cofaktorenbedingungen wohl eine hohe katalytische Aktivität der Dehydrogenase(n) und möglicherweise auch der Isomerase(n) gewährleisten, jedoch im Hinblick auf eine hohe Cyclase- und Oxidaseaktivität noch wenig befriedigend sind.

Durch die Optimierung der beiden in-vitro Testsysteme mit ^{14}C -MVA bzw. ^{14}C -Phytoen sind nun Bedingungen erarbeitet worden, die es erlauben, die Aktivität der einzelnen carotinoidsynthetisierenden Enzyme im membrangebundenen Zustand nachzuweisen.

Damit ist die Voraussetzung dafür geschaffen, durch den Einsatz weiterer radioaktiv markierter Intermediate und spezifisch wirkender Hemmstoffe (z.B. der Dehydrierung oder Cyclisierung) einzelne Schritte des Biosyntheseweges bzw. der sie katalysierenden Enzyme weiter zu prüfen.

Solubilisierung und Reaktivierung der Phytoensynthese

Als nächster Schritt sollten Solubilisierungsbedingungen geschaffen werden, die die Phytoensynthese effektiv von der Membran unter Erhaltung ihrer enzymatisch aktiven Struktur lösen.

Im Vergleich zu Narcissus (Kreuz et al., 1982), Capsicum (Camara, 1985) und Phycomyces (Bramley, 1985), wo bereits durch 10 mM MgCl_2 oder durch 50 bzw. 500 mM Trispuffer, die relativ schwachen elektrostatischen Bindungen zwischen Lipidmatrix und Phytoensynthasekomplex gelöst werden konnten, ist es bei Neurospora weder mit 18,8 mM MgCl_2 und 200 mM Tris, noch durch "high salt"-Behandlungen mit KCl (0,5-2 M) möglich die Phytoensynthese von der Membran zu lösen (Tab. 4).

Demzufolge muß eine stärkere Assoziation zwischen Phytoensynthase und dem hydrophoben "core" der Membran angenommen werden. Ähnliche Verhältnisse sind auch über den Phytoensynthasekomplex im Spinatchloroplasten bekannt (Lutke-Brinkhaus et al., 1982; 1987); in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand des Spinatplastiden ist dieser Enzymkomplex bei etioliierten Pflanzen löslich, während im ausdifferenzierten Chloroplasten eine stärkere Bindung des Komplexes mit der "Envelope"-Membran vorliegt. Um diese stärkeren hydrophoben Interaktionen zwischen Phytoensynthase und Membran zu zerstören, wurde CHAPS, ein zwitterionisches Detergenz, eingesetzt.

Die Analyse der solubilisierenden Eigenschaften von CHAPS auf die Membranproteine und Membranlipide von *N. crassa* läßt erkennen, daß bei CHAPS-Konzentrationen, die über der kritischen Micellenkonzentration (CMC: 6-8 mM) liegen, eine effektive Solubilisierung von Membranproteinen und Lipiden (Tab. 5) durchgeführt werden kann, ohne daß eine konzentrationsabhängige (10-50-100 mM) selektive Solubilisierung bestimmter Proteine oder Lipide eintritt (Abb. 7 und 8). Vergleichbare Befunde über CHAPS als solubilisierendes Agens liegen für *Narcissus* vor (Beyer et al., 1985).

Auch Untersuchungen an Saccharose-Carrierproteinen (M'Batchi et al., 1987) zeigten, daß mit CHAPS im Vergleich zu anderen solubilisierenden Agentien wie EGTA (Chelator), Harnstoff (Chaotropes Agens) und sogar gegenüber Na-Cholat (anionisches Detergenz) eine effektivere Solubilisierung von stärker gebundenen Membranproteinen durchgeführt werden kann. Neben diesen guten disaggregierenden Eigenschaften von CHAPS wurde in der Literatur vor allem noch auf seine geringe denaturierende Wirkung hingewiesen. Dies konnte auch bei der Solubilisierung von Cytochrom P-450 von Hjelmeland (1980) bestätigt werden.

Eingehende Untersuchungen über die CHAPS-Sensitivität des GGPP-liefernden Kürbisendospermsystems und der membrange-

bundenen Phytoensynthase im kombinierten in-vitro Test ergaben (Abb. 9), daß CHAPS in Abhängigkeit von der Konzentration deutlichen Einfluß auf die in-vitro Phytoensyntheseleistung nimmt. Während die GGPP-Bildung durch die vorgegebenen CHAPS-Konzentrationen von 0-7 mmol/l weitgehend unbeeinflußt bleibt, wird die Aktivität der membrangebundenen Phytoensynthase stark von der im kombinierten in-vitro Test vorgegebenen Konzentration beeinflusst. Bis zu einer CHAPS-Konzentration von 1,5 mmol/l zeigt die Phytoensynthase optimale katalytische Aktivität, höhere Konzentrationen von CHAPS-Monomeren ($>2,5$ mmol/l) führen dagegen zu einer drastischen Reduktion der membrangebundenen Phytoensynthaseaktivität.

Eine ähnliche konzentrationsabhängige Wirkung von CHAPS auf die enzymatische Aktivität zeigte sich bei Untersuchungen an Cytochrom P-450 (Wagner et al., 1984). Ein negativer bzw. schädigender Einfluß von CHAPS-Monomeren ($>2,5$ mM) bzw. CHAPS-Micellen (>10 mM) auf die β -Carotin-synthetisierenden Enzyme konnte schließlich auch bei Narcissus (Beyer et al., 1985) nachgewiesen werden.

Auf Grund dieser Erkenntnisse wurde bei den vorliegenden Untersuchungen stets darauf geachtet, daß zur Überprüfung der solubilisierten Phytoensynthaseaktivität im in-vitro Test eine CHAPS-Konzentration von $>2,2$ mmol/l nicht überschritten wurde.

Beim Versuch die Phytoensynthase zu solubilisieren wurden drei verschiedene CHAPS-Konzentrationen (10, 50 und 100 mmol/l) eingesetzt.

Die Intention dabei war, einmal unter möglichst schonenden Bedingungen die Phytoensynthase in Form von sog. Mischmicellen unter Erhaltung ihrer katalytischen Aktivität von der Lipidmatrix zu lösen. Bei diesen niedrigen Detergenzkonzentrationen entstehen heterogene Protein-Lipid-CHAPS-Micellen. Erst bei einem Überangebot an Detergenzmicellen (bei 50 und 100 mmol/l) entstehen beim Solubilisierungsprozeß neben proteinfreien CHAPS-Lipid-Micellen überwiegend lipidfreie Protein-CHAPS-Micellen, die nur 1 oder 2 Polypeptide enthalten, die auch in der Membran zu einem Komplex assoziiert sind (Helenius et al.,

1975; 1979; Tanford et al., 1976). Durch diese maximale Disaggregation der verschiedenen Proteinspezies sollte die Möglichkeit geschaffen werden, bei späteren Aufreinigungsschritten Lipid-Detergenz-Micellen von "reinen" Membranproteinkomplexen zu trennen. Außerdem könnten nach einer solchen Trennung spezifische Lipidabhängigkeiten aufgeklärt werden.

Die in-vitro Syntheseleistungen der verschiedenen Solubilisate (10-50-100 mM), die in Tabelle 6 dargestellt sind, zeigen deutlich, daß mit 10 mmol/l CHAPS eine partielle Solubilisierung der Phytoensynthaseaktivität erreicht werden kann, während 50 und 100 mmol/l CHAPS nicht geeignet zu sein scheinen, um die solubilisierete Enzymaktivität im kombinierten in-vitro Test nachzuweisen, obwohl bei allen Proben eine Rekonstitution der gelösten Enzyme mit Lipiden durchgeführt wurde.

Als mögliche Ursachen für die fehlende enzymatische Aktivität der Phytoensynthase im "50 und 100 mM-Solubilisat" lassen sich im wesentlichen 2 Punkte diskutieren:

Bei so hohen Detergenzkonzentrationen kann eine denaturierende Wirkung nicht ausgeschlossen werden, zumal bei Untersuchungen an einem Photorezeptorsystem bei 16 mM CHAPS bereits eine Denaturierung beobachtet wurde (Cook et al., 1986). Möglich ist aber auch ein Adsorptionsverlust der Phytoensynthase an den hydrophilen Membranfiltern YM 30, die zur Entfernung von Chapsmicellen (6-10 kD; Beyer et al., 1985) und zur Konzentrierung der Protein-CHAPS-Micellen im Solubilisat verwendet wurden. Es wäre denkbar, daß die Phytoensynthase - bedingt durch ihre Rolle als Bindeglied zwischen löslichem und membrangebundenem Teil der Carotinoidbiosynthese - relativ große hydrophile Domänen besitzt, die große Affinität zu den hydrophilen YM 30-Filtern zeigen. Eine starke Affinität und ein damit verbundener Adsorptionsverlust an diesen Filtern wurde auch beim peripheren Phytoensynthasekomplex von *Narcissus* beobachtet (Beyer, persönliche Mitteilung).

Die mit 10 mmol/l CHAPS solubilisierete Phytoensynthase wies im

Vergleich zum membrangebundenen Enzym eine deutlich verminderte in-vitro-Syntheseleistung auf (s. Tab. 1 und 6). Primäres Ziel sollte es daher sein, die aus dem natürlichen Lipidmilieu gelöste Phytoensynthase zu reaktivieren und schließlich in-vitro Testbedingungen zu erarbeiten, die trotz der gleichzeitig ablaufenden GGPP-Metabolisierung zum Kauren durch das Kürbissystem, eine gute ^{14}C -Markierung von Phytoen ermöglichen.

Obwohl bereits im "10 mM-Solubilisat" ein "endogener" Lipid-pool in Form von Protein-Lipid-CHAPS-Micellen und zu einem geringeren Teil als proteinfreie Lipid-Detergenz-Micellen vorliegt, kann durch Zugabe von 1,4 mmol/l (entsprechen 8 mg) Neurospora-Membranlipiden die Phytoensynthaseaktivität deutlich gesteigert werden (Tab. 7).

Die Lipid-Rekonstitution erfolgte nach der Freeze-thaw-Sonifier- bzw. Sonifiertechnik.

Auf welche Weise Lipide auf die solubilisierete Phytoensynthase eine aktivitätsfördernde Wirkung ausüben, ist relativ unklar. Genauere Vorstellungen über diese komplexen Lipid-Protein-Wechselwirkungen konnten durch Untersuchungen an membran-gebundenen Enzymen, wie der Na^+K^+ -ATPase, der 3-Hydroxy-butyrate-Dehydrogenase und der Diacylglycerin-Kinase gewonnen werden (Sandermann, 1982; Bohnenberger et al., 1983; Russ et al., 1988), die nach Solubilisierung und Aufreinigung als lipidfreie Apoenzyme durch exogene Lipide aktiviert werden konnten. Diskutiert wurde in diesem Zusammenhang eine Reaktivierung des Apoproteins durch sog. "fluid lipids", die mit ihren hydrophoben und hydrophilen Gruppen für eine protein-spezifische Lipidanheftung an die jeweiligen Aminosäuregruppen der Proteine sorgen. Sie könnten somit die natürliche Membrenumgebung ersetzen und die native Konformation der Enzyme wiederherstellen (Bohnenberger et al., 1983). Es wurden auch Modelle entwickelt und untersucht, die Lipide als allosterische Effektoren, die an bestimmte Stellen des Enzyms binden, plausibel machen sollten (Freedman, 1981; Sandermann, 1982; Russ et al., 1988). Denkbar wäre aber auch, daß die entstandenen Lipidvesikel den integrierten Enzymen die

Möglichkeit bieten, ihre typisch vektorielle Aktivität zu demonstrieren; d.h. das Enzym könnte z.B. das hydrophile Substrat von der nach außen zum wässrigen Milieu hin orientierten Seite aufnehmen und das lipophile Produkt in den hydrophoben Teil des Lipidvesikels abgeben (Freedman, 1981; Kreuz et al., 1982). Letzlich kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß die lipidbedingte Steigerung der enzymatischen Aktivität auf einer einfachen Solubilisierung des wasserunlöslichen, lipophilen Substrates beruht, wodurch der Transport des Substrates zum katalytischen Zentrum des Enzyms erleichtert wird; häufig können auch amphiphile Substanzen, wie z.B. Detergenzien Lipide in ihrer Funktion ersetzen (Wagner et al., 1984; Camara et al., 1986).

Die Rekonstitution der solubilisierten Proteine wurde bei einer CHAPS-Konzentration von 10 mmol/l durchgeführt (Tab. 8). Bei dieser Detergenzkonzentration, die über der CMC (6-8 mM) liegt, sind zwei wesentliche Voraussetzungen erfüllt, die vor allem über die Effektivität des Rekonstitutionsvorganges entscheiden. Zum einen ist die Stabilität der Mischmicellen gewährleistet (Hjelmeland, 1978); dadurch wird die Bildung von Proteinaggregaten verhindert und die hydrophoben Bereiche der solubilisierten Proteine können so ungehindert mit den Lipidvesikeln interagieren (Rogers and Strittmatter, 1973). Andererseits erweisen sich bei 10 mM CHAPS die Liposomen, die bei der Rekonstitution entstanden sind, gegenüber den solubilisierenden Detergenzmicellen als relativ stabil. Elektronenmikroskopische Aufnahmen ließen erkennen, daß bei diesem Rekonstitutionsvorgang mit dem "10 mM-Solubilisat" vor allem unilamelläre Liposomen mit einem Durchmesser von etwa 30 nm entstanden waren (Abb. 11). Das Entstehen von überwiegend unilamellären gegenüber multilamellären Liposomen gilt als starker Hinweis dafür, daß während des Rekonstitutionsvorganges hydrophobe Membranproteine in die Lipidvesikel inkorporiert wurden (Wrigglesworth, 1984). Ob jedoch diese Liposomen schon die Phytoensynthase inkorporiert hatten, konnte nicht bewiesen werden. Spätere Aufreinigungen

des rekonstituierten "10 mM-Solubilisates" sollten genaueren Einblicken in diese Vorgänge ermöglichen.

Für den in-vitro Test wurde die CHAPS-Konzentration auf 1,3-1,6 mmol/l verdünnt; diese Detergenzkonzentrationen hatten zu keiner erkennbaren Schädigung der membrangebundenen Phytoensyntheseaktivität geführt (Abb. 9). Bei diesem Verdünnungsschritt wird die CMC deutlich unterschritten und dabei verlieren die Mischmicellen ihre Stabilität (Hjelmeland, 1978); dies bedeutet, daß Proteine aus den Protein-Lipid-CHAPS-Micellen freigesetzt werden und möglicherweise mit den vorhandenen endogenen Lipiden bzw. exogen zugegebenen liposomalen Membranstrukturen die Bildung von größeren Protein-Lipid-Assoziationen eingeleitet wird. Die eigentliche Insertion der Proteine in die Lipidvesikel könnte somit eventuell erst zu diesem Zeitpunkt erfolgen (Helenius and Simons, 1975; Simons et al., 1978; Freedman, 1981; Rigaud et al., 1988). Es konnte daher nicht eindeutig geklärt werden, ob der Vorgang der Lipid-Rekonstitution der Phytoensynthese allein durch den Freeze-thaw-Cyclus bzw. die Ultraschallbehandlung oder zusätzlich bzw. ausschließlich durch das Unterschreiten der CMC in Vorbereitung auf den Enzymtest erfolgte.

Die Bildung von größeren Protein-Lipid-Komplexen nach Unterschreiten der CMC, wie sie von Helenius (1975), Simons (1978) und Freeman (1981) beschrieben wird, könnte aber zumindest die relativ hohe Phytoensyntheseaktivität des "10 mM-Solubilisates" ohne Zugabe von exogenen Lipiden erklären.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die membran-gebundene Phytoensynthese mit 10 mmol/l CHAPS effektiv solubilisiert werden kann. Die geringe enzymatische Aktivität der Phytoensynthese nach Solubilisierung kann durch Membranlipide eindeutig gesteigert werden. Eine Optimierung der in-vitro Testbedingungen führt zu einer weiteren Steigerung der solubilisierten und rekonstituierten Phytoensyntheseaktivität. Im Gegensatz zu den Phytoensynthese-Komplexen bei anderen

carotinoidsynthetisierenden Organismen wie *Narcissus*, *Capsicum*, *Phycomyces* und *Aspergillus* ist die Phytoensynthese von *Neurospora* stark mit der Membran assoziiert.

Solubilisierung und Rekonstitution der weiteren carotinoid-synthetisierenden Enzyme

Beim Versuch, mit CHAPS die integralen Phytoen-metabolisierenden Enzyme zu solubilisieren zeigte sich, daß kein signifikanter Unterschied in der Phytoenumsetzung zu erkennen ist, unabhängig davon, ob die Solubilisierung mit 10 oder mit 75 mmol/l CHAPS durchgeführt wurde. Der Einwand, daß CHAPS ein zu schwaches Detergenz ist, um integrale Membranproteine von der Lipidmatrix zu lösen, kann durch Untersuchungen mit dem mikrosomalen Cytochrom P-450-System entkräftet werden; bereits bei einer CHAPS-Konzentration von 10 mmol/l konnten die starken Bindungen zwischen diesen extrem hydrophoben Membranproteinen (Cytochrom P-450 und dazugehörige Reduktase) und der Membran gelöst werden (Hjelmeland, 1980). Die nach Solubilisierung geringe Isomerisierungs-, Dehydrogenierungs- und Cyclisierungs-Aktivität konnte durch liposomale Membranstrukturen um das 6-7-fache gesteigert werden (Tab. 9). Trotz dieses Versuches, die natürliche Lipidumgebung wiederherzustellen, zeigt sich im Vergleich zu den membrangebundenen Enzymen eine deutlich reduzierte Synthese von ungesättigten Carotinoiden.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse ist jedoch nicht auszuschließen, daß das angebotene Phytoen bis zum Phytofluen und ζ -Carotin umgesetzt wird.

Eine Akkumulation von Phytofluen bzw. ζ -Carotin, die noch relativ stark gesättigte Carotinoide sind, könnte folgendermaßen erklärt werden.

Bei Untersuchungen mit Cytochrom P-450 und der dazugehörigen Reduktase zeigte sich, daß CHAPS nicht nur effektiv die beiden integralen Membranproteine aus der Lipidmatrix lösen kann, sondern daß CHAPS auch den Aggregationszustand beider Enzyme beeinflusst (Wagner et al., 1984). Daher kann vermutet werden,

daß nach Solubilisierung der integralen Phytoen-metabolisierenden Enzyme mit CHAPS (10 und 75 mmol/l) die einzelnen Enzymaktivitäten in verschiedenen Detergenzmicellen vorliegen und somit ein räumlich gestörter Carotinoid-biosyntheseweg vorliegt, ebenso wie es für *Narcissus* nach Solubilisierung postuliert wird (Beyer et al., 1985). Bei *Narcissus* gelang es durch Rekonstitution nach der Freeze-thaw-Technik die einzelnen Enzyme des Biosyntheseweges bis zum β -Carotin wieder in einem Liposom zusammenzuführen; denn nur so konnte es erklärt werden, weshalb auf dem Weg vom Phytoen zum β -Carotin außer geringen Mengen an Phytofluen keine weiteren Zwischenprodukte nachgewiesen werden konnten (Beyer et al., 1985). Bei *Neurospora* scheint dies nicht möglich zu sein. In-vivo (Mitzka und Rau, 1977; Seigner L., 1984) und in-vitro Befunde (s. Abschnitt II.1.1.3.) lassen erkennen, daß bei *Neurospora* die Phytoenmetabolisierenden Enzyme selbst im Membranverband lange nicht so effektiv Phytoen weiterleiten, wie dies bei *Narcissus* (Beyer et al., 1980) und bei dem Pilz *Phycomyces* (De La Guardia et al., 1971; De La Concha et al., 1983) erfolgt, bei denen fast ausschließlich β -Carotin gebildet wird. Daher kann man annehmen, daß bei *Neurospora* im Gegensatz zu *Narcissus* und *Phycomyces* die Enzyme, die an der Umsetzung von Phytoen beteiligt sind, in nicht so enger Kooperativität zueinander stehen. Vielleicht ist dieser Unterschied darin begründet, daß bei *Narcissus* und bei *Phycomyces* die einzelnen Enzyme z.B. in Art eines Multienzymkomplexes assoziiert sind, wie es von De La Guardia (1971) postuliert wurde. Bei *Neurospora* scheint dieser enge Kontakt zwischen diesen Enzymen nicht realisiert zu sein. Es wäre daher nicht weiter erstaunlich, daß insbesondere nach Solubilisierung und Rekonstitution die Weiterleitung von Phytoen deutlich verringert ist. Eine Akkumulation von Phytofluen bzw. ζ -Carotin könnte somit erklärt werden. Grund für die unbefriedigende in-vitro Synthese von ungesättigten Carotinoiden kann auch die Detergenzkonzentration sein, die für den Enzymtest eingestellt wurde. Für das solubilisierete und rekonstituierte Phytoen-

metabolisierende System von *Narcissus* wird ein optimaler CHAPS-Bereich von 1,25-10 mmol/l angegeben (Beyer, 1987). Höhere (>10 mmol/l) und niedrigere (<1,25 mmol/l) Detergenzkonzentrationen führen zu einer drastisch verminderten β -Carotin-Syntheseaktivität; dabei sind die Gründe für den Aktivitätsverlust bei geringen CHAPS-Konzentrationen nicht bekannt. Für *Neurospora* könnte demzufolge eine Konzentration von 1,6 mmol/l CHAPS zwar eine optimale Phytoensyntheseaktivität gewährleisten (s. Abschnitt III.1.2.2.2.), im Hinblick auf eine hohe Syntheseleistung der nachfolgenden Enzyme jedoch ungeeignet sein.

Während es also für die aus dem Membranverband gelöste Phytoensynthese bereits gelungen ist, die enzymatische Aktivität durch Membranlipide zu steigern und somit die Voraussetzungen für eine Aufreinigung und zukünftige Anreicherung z.B. über Chromatofokussierung bereits geschaffen sind, müssen im Falle der weiteren carotinoidsynthetisierenden Enzyme noch spezielle Techniken und Bedingungen untersucht werden, die eine Reaktivierung der solubilisierten Dehydrogenase-, Cyclase-, Oxidase- und Isomerase-Aktivitäten ermöglichen.

Lichtbedingte Veränderungen auf der Ebene der m-RNA und der Membranproteine

Wie schon am Anfang dieser Diskussion ausgeführt wurde, konnte der direkte Nachweis, daß eine lichtinduzierte de novo Synthese der carotinoidsynthetisierenden Enzyme über eine Transkriptionskontrolle erfolgt deshalb nicht geführt werden, weil die Enzyme nicht isoliert und damit die Voraussetzungen für die Produktion von spezifischen Antikörpern nicht erfüllt sind. Das Auftreten von spezifischen, lichtinduzierten messenger-RNAs konnte bei Pflanzen mit Hilfe von immunologischen Nachweismethoden (Antikörpern) bisher z.B. für bestimmte Enzyme der Flavonoidbiosynthese (Hahlbrock et al., 1981; Jones, 1984) und für ein Apoprotein des Photosynthesekomplexes II (Apel, 1979) eindeutig nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit war eine Annäherung an die in der Einleitung dargestellte Fragestellung nur dadurch möglich, daß versucht wurde für die in früheren Untersuchungen (Mitzka-Schnabel et al., 1984) gefundenen lichtinduzierten Proteine bei *Neurospora crassa* eine präzisere Korrelation mit der Carotinoidbiosynthese zu erstellen; Kinetiken der lichtbedingten Intensitätsänderungen von in-vitro und in-vivo translatierten Proteinen sollten dazu beitragen.

Bei Untersuchungen auf der Ebene der m-RNA wurde weder ein lichtbedingter Anstieg von Poly A⁺-RNA noch eine induktionsbedingte Steigerung der Translationaktivität eindeutig gefunden (Tab. 10).

Bei der Beurteilung der Poly A⁺-RNA-Gehalte sollte folgender Aspekt nicht unberücksichtigt bleiben: Durch die Anreicherung an Oligo-dT-Cellulose-Säulen werden m-RNAs erfaßt, die eine Poly A-Sequenz aufweisen; so werden mit Sicherheit mitochondriale RNAs, die auf Grund ihres prokaryontischen Ursprungs keine Poly A-Sequenz besitzen, nicht erfaßt, ebenso wenig bestimmte cytoplasmatische RNA-Spezies, die u.U. keine solche Sequenz haben (Hall et al., 1979). Für die Carotinoidbiosynthese dürfte deren Bedeutung jedoch gering sein (Mitzka-Schnabel und Rau, 1981). Da die Poly A-Sequenz dem primären m-RNA Transkript unmittelbar nach der Transkription angehängt wird, werden über die Oligo-dT-Säule nicht nur aktive, polysomale m-RNA, sondern auch pre-m-RNA und maskierte RNA isoliert. Dies könnte unter Umständen die unterschiedlichen Translationsaktivitäten der einzelnen m-RNAs pro µg Poly A⁺-RNA (Tab. 10) erklären. Eine drastische Zunahme der Translationsaktivität nach Lichtinduktion ist ohnehin nicht zu erwarten, weil die an der Carotinoidsynthese beteiligten, de novo synthetisierten Enzyme ja nur einen relativ geringen Anteil am Gesamtprotein darstellen.

Obwohl also weder die Menge der Poly A⁺-RNA noch ihre Matrizenaktivität nach Belichtung eindeutig zunahm, konnten dennoch nach optischer Auswertung der in-vitro translatierten

³⁵S-markierten Proteine bestimmte m-RNA-Spezies an Hand ihrer Translationsprodukte nachgewiesen werden, die nach Lichtinduktion verstärkt auftraten (Abb. 13; Abb. 14). Es ließ sich eindeutig zeigen, daß nach Belichtung im untersuchten pH-Bereich (4-7) und Molekularbereich (95-3,6 kD) 9 Polypeptidspots einen deutlichen Intensitätsanstieg im Verlauf der Nachreaktionszeit aufweisen, ohne daß Spots verschwinden. Obwohl der Nachweis der Spezifität dieser in-vitro translatierten Proteine, die Ausdruck für lichtinduzierte m-RNA-Spezies sind, derzeit durch immunologische Nachweisverfahren nicht möglich ist, konnten trotzdem einzelne lichtinduzierte Polypeptide an Hand der Kinetik ihrer Intensitätsänderungen in einen Zusammenhang mit der Carotinoidbiosynthese gestellt werden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Akkumulationskinetiken der Carotinoide bei *Neurospora* (Rau und Rau-Hund, 1977) und aus den Studien mit Hemmstoffen der Translation (Rau, 1968) sollten diejenigen Polypeptidspots, die in Korrelation mit der Carotinoidbiosynthese stehen folgende Merkmale in ihren Intensitätskurven aufweisen: Nach Lichtinduktion sollte ein Intensitätsanstieg zu verzeichnen sein; in Übereinstimmung mit den Versuchen zur Cycloheximidhemmung der Carotinoidsynthese sollte die Translation der spezifisch für die Carotinoidbiosynthese relevanten m-RNAs bis etwa 30 min. nach Belichtung abgeschlossen sein. Die Intensitäten der dazugehörigen Polypeptidspots sollte daher zwischen 30 und 60 Minuten nach Lichtinduktion wieder auf dem Ausgangslevel sein. Die Polypeptidspots Nr. 5, 6 und 8 (Abb. 13 und 14) stehen daher offenbar nicht in Zusammenhang mit der Carotinoidbiosynthese. Dagegen lassen sich die Polypeptide 3 und 4 zeitlich sehr gut mit der Carotinoidbiosynthese korrelieren, darüberhinaus möglicherweise auch die Spots 7 und 9, wenn man die Schwierigkeiten bei der Auswertung der Fluorogramme auf Grund unterschiedlicher Hintergrundsschwärzung in Betracht zieht. Bei Polypeptid 1 und 2 liegen die Intensitäten nach 60 Minuten noch deutlich über dem Ausgangswert, sodaß eine Korrelation dieser Spots mit der Pigmentsynthese fraglich ist.

Diese Polypeptide und die Polypeptide 5, 6 und 8 könnten vielleicht in Zusammenhang mit anderen lichtinduzierten Proteinbildungsprozessen stehen.

Dieser Zusammenhang zwischen den nach Lichtinduktion via Gen-derepression de novo synthetisierten Proteinen und der Carotinoidbiosynthese sollte auch auf der Ebene der Membranproteine untersucht werden. Da die carotinoidbildenden Enzyme zu über 80 % in einer Membranfraktion (Mitzka-Schnabel und Rau, 1981) lokalisiert sind, sollte auch an Hand der Kinetik der nach Belichtung verstärkt auftretenden Intensitätsänderungen der in-vivo translatierten Membranproteine eine Korrelation mit der Carotinoidbiosynthese möglich sein. Abb. 15 zeigt, daß der Einbau des angebotenen ^{35}S -Methionins ins Myzel wie auch in die Membranproteine bis 30 Minuten nach der Belichtung gegenüber den Dunkelkontrollen erhöht ist. Die bei diesen Versuchen gefundene Steigerung der Einbaurate von radioaktiv markiertem Methionin in die neu synthetisierten Proteine des Myzels und speziell in die Membranproteine unterstützt die Annahme, daß nach einem Blaulichtimpuls bestimmte Proteine verstärkt synthetisiert werden. Die wesentlichen lichtbedingten Syntheseprozesse scheinen dabei bis etwa 30 Minuten nach Belichtung abgeschlossen zu sein. Nach Auftrennung der ^{35}S -Puls-markierten Membranproteine ließ sich zeigen, daß nach Belichtung die Intensität von vier Polypeptiden deutlich zunimmt. Auf Grund des Verlaufes ihrer Intensitätskurven ist dennoch eine Korrelation dieser nach Belichtung verstärkt auftretenden Polypeptide mit der Carotinoidbiosynthese nicht möglich. Auf der Ebene der Membranproteine konnte demzufolge an Hand einer in-vivo Puls-Markierung lichtbedingte Veränderungen, die in einem Zusammenhang mit der Pigmentsynthese stehen, nicht nachgewiesen werden. Die auftretenden, lichtbedingten Veränderungen im Bereich der Membranproteine sind wahrscheinlich zu gering, um einen eindeutigen Nachweis zu erbringen.

Eine genauere Betrachtung der nach Belichtung verstärkt auf-

tretenden Polypeptide, die nach m-RNA-Isolierung und in-vitro Translation über 2-dimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, macht deutlich, daß die Molekulargewichte der relevanten Polypeptide vor allem im niedermolekularen Bereich liegen. Es besteht dabei die Gefahr, daß es sich um Artefakte handelt. Da RNA-"Bruchstücke" ohne "cap-" und Poly A-Sequenz zumindest nicht vom Reticulozytenlysat translatiert werden (Rhoads et al., 1973), könnten derartige niedermolekulare Artefakte lediglich bei der Aufarbeitung der Translationsprodukte entstehen. Die gute Reproduzierbarkeit des Auftretens dieser Polypeptide entkräftet aber diesen Einwand, zumal gerade im niedermolekularen Bereich ein Polypeptidspot identisch ist mit einem Polypeptidspot aus Untersuchungen von Mitzka-Schnabel et al., 1984; dabei entspricht Spot Nr. 7 (MG: 5,5; IEP: 5,80) der vorliegenden Arbeit dem Polypeptidspot Nr. 11, der von Mitzka-Schnabel gefunden wurde. Diejenigen 4 in-vitro translatierten Polypeptide (Spot Nr. 3, 4, 7 und 9), die auf Grund ihrer Kinetik mit der Carotinoidsynthese in Korrelation gestellt werden konnten, weisen z.T. zeitlich verzögerte Intensitätsmaximas (Abb. 14) auf; dies könnte in Übereinstimmung mit der von Lang und Rau (1972) diskutierten sequentiellen Induktion der einzelnen carotinoidsynthetisierenden Enzyme stehen, die nach Lichtinduktion eingeleitet wird.

Über das Molekulargewicht und den isoelektrischen Punkt der carotinoidsynthetisierenden Enzyme bei anderen Organismen ist relativ wenig bekannt. Angaben über den isoelektrischen Punkt des Phytoensynthasekomplexes liegen lediglich bei Narcissus vor (Beyer, 1987). Bei der Chromatofokussierung wurde dieser Enzymkomplex, der IPP zu Phytoen umsetzt, bei einem pH von 5,3-5,1 von der Säule eluiert; in diesem pH-Bereich sollte der isoelektrische Punkt des Komplexes liegen (s. Manual zur Chromatofokussierung, Pharmacia). Das Molekulargewicht des Phytoensynthasekomplexes wurde bei Narcissus nicht ermittelt; dagegen konnte nach Gelfiltration das Molekulargewicht dieses Enzymkomplexes bei Capsicum (Camara, 1985) wie auch bei

Tomaten mit 166 000-190 000 Dalton (Maudinas et al., 1977; Spurgeon et al., 1984; Jones et al., 1985) angegeben werden. Die eigentliche Phytoensynthase, die 2 Moleküle GGPP zu Phytoen kondensiert, ist von ihrem Molekulargewicht her nie charakterisiert worden, weil eine Isolierung und Abtrennung der Phytoensynthaseaktivität von IPP-Isomerase und Prenyltransferase aus dem gesamten Enzymkomplex bislang unmöglich ist. Auf Grund von Berechnungen wurde schließlich für die eigentliche Phytoensynthase bei Tomatenfruchtplastiden ein Molekulargewicht von 66 000 Dalton angenommen (Spurgeon et al., 1984). Über die Enzyme, die Phytoen zu den ungesättigten Carotinoiden umsetzen, liegen bei den anderen untersuchten Organismen keine genauen Angaben über Molekulargewicht und isoelektrischen Punkt vor. Beyer (1985; 1987) gibt die Micellengröße der mit 100 mM-CHAPS solubilisierten und in Mischmicellen vorliegenden Enzyme mit 50-60 kDalton an. Da reine CHAPS-Micellen eine Größe von 6-10 kDalton haben, sollten die einzelnen, in Mischmicellen inkorporierten Phytoenmetabolisierenden Enzyme ein Molekulargewicht von etwa 40-50 kDalton aufweisen.

Ein Vergleich dieser Befunde mit den Molekulargewichten und IEPs der nach Belichtung verstärkt auftretenden in-vitro translatierten Proteine (s. Abb. 14), die in einen Zusammenhang mit der Carotinoidsynthese gestellt wurden, ist kaum möglich, zumal die Methoden zur Bestimmung des Molekulargewichtes und des isoelektrischen Punktes völlig verschieden sind. Nach 2-dimensionaler Gelelektrophorese mit SDS werden nur Polypeptide erfaßt, während mittels Gelfiltration und Chromatofokussierung in Gegenwart von Detergenzien wie Tween 80 und CHAPS Proteine und Proteinkomplexe charakterisiert werden (Tanford et al., 1976; Newby and Chrambach, 1979). Zudem weisen Tanford (1976) und Machold (1974) auf methodisch bedingte Schwankungen bei der Bestimmung des Molekulargewichtes hin, die sich sowohl nach SDS-Gelelektrophorese wie auch nach Gelfiltration ergeben.

Während es also auf der Ebene der Membranproteine nicht

möglich war, die lichtbedingten Veränderungen einzelner Polypeptidspots mit der Pigmentsynthese zu korrelieren, konnten auf der Ebene der messenger-RNA bestimmte m-RNA-Spezies anhand der Kinetiken der Intensitäten der nach Belichtung verstärkt auftretenden in-vitro translatierten Proteine in einen Zusammenhang mit der Carotinoidbiosynthese gestellt werden. Der direkte Nachweis für die Spezifität dieser m-RNA-Spezies mit den dazugehörigen Polypeptiden und damit ihr Zusammenhang mit der Farbstoffsynthese kann erst immunologisch erbracht werden. Inwieweit die Grundvoraussetzungen für diese immunologischen Nachweisverfahren bereits im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit geschaffen wurden, ist weiter oben dargestellt.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Der Nachweis, daß nach Photoinduktion via Genderepression die carotinoidbildenden Enzyme de novo synthetisiert werden, setzt eine Anreicherung und Charakterisierung der beteiligten Enzyme voraus. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, bei *Neurospora crassa*, einem Pilz mit strikt photokontrollierter Pigmentsynthese, die membrangebundenen carotinoidsynthetisierenden Enzyme zu solubilisieren und die Enzymaktivitäten nach Solubilisierung zu rekonstituieren, um damit die Grundlagen für eine Anreicherung zu schaffen. Nur nach einer Anreicherung dieser Enzyme, der Phytoensynthase und der Enzyme, die Phytoen weiter zu den ungesättigteren Carotinoiden umsetzen, sind immunologische Nachweisverfahren möglich, wodurch lichtinduzierte aktive messenger-RNA für die carotinoidbildenden Enzyme identifiziert werden können.
2. In einem kombinierten in-vitro System aus Kürbis-Endosperm und Membranen von *Neurospora* mit ^{14}C -MVA als Ausgangssubstrat konnte die Syntheseleistung der membrangebundenen Phytoensynthase entscheidend verbessert werden; dadurch war es zusätzlich möglich, radioaktiv markiertes Phytoen in ausreichendem Maße zu isolieren und anschließend im in-vitro Test als Substrat einzusetzen.
3. Im kombinierten Enzymtest mit ^{14}C -MVA war die Phytoen-metabolisierung zu den ungesättigteren Carotinoiden sehr gering (unter 5-7 %). Mit ^{14}C -Phytoen, das den membrangebundenen Enzymen in Form von Liposomen angeboten wurde, sowie durch ein speziell ausgearbeitetes Cofaktorenangebot konnte die in-vitro Synthese der ungesättigteren Carotinoide um das 8-fache gesteigert werden; das System ist nun soweit optimiert, daß es nahezu die Aktivität von in-vivo Bedingungen zeigt.

Damit wurde ein in-vitro System geschaffen, das es erlaubt, die einzelnen Enzymaktivitäten auf dem Syntheseweg der ungesättigten Carotinoide genauer zu untersuchen.

4. Versuche die membrangebundene Phytoensynthase mit "high salt"-Behandlungen (0,5-2 M KCl) zu solubilisieren, zeigten, daß im Gegensatz zu anderen Organismen zwischen der Phytoensynthase von Neurospora und dem hydrophoben "core" der Membran relativ starke Wechselwirkungen bestehen müssen, die durch hohe Ionenstärken nicht zu zerstören sind.
5. Um diese relativ starken hydrophoben Interaktionen zwischen Phytoensynthase und Lipidmatrix zu lösen, wurde CHAPS, ein zwitterionisches Detergenz eingesetzt. Mit CHAPS-Konzentrationen, die über der kritischen Micellenkonzentration (CMC: 6-8 mM) liegen, kann eine effektive Solubilisierung von Membranproteinen und Membranlipiden durchgeführt werden. Im "10 mM-Solubilisat" konnte die enzymatische Aktivität der Phytoensynthase nachgewiesen werden; höhere CHAPS-Konzentrationen waren dagegen ungeeignet, um die Aktivität des solubilisierten Enzyms zu erfassen. Die Überprüfung der enzymatischen Aktivität erfolgte bei einer deutlich geringeren CHAPS-Konzentration (< 2,2 mmol/l).
6. Um die Phytoensynthase zu reaktivieren, die nach Solubilisierung eine im Vergleich zum membrangebundenen Enzym deutlich verringerte Syntheseaktivität aufwies, wurde versucht, das fehlende oder gestörte Lipidmilieu wiederherzustellen. Als Techniken für diese Lipid-Rekonstitution sind Sonifier- bzw. Freeze-thaw-Sonifier-technik gleichermaßen geeignet. Die solubilisierete Phytoensynthase konnte durch Zugabe von Membranlipiden in ihrer Aktivität deutlich gesteigert werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß während

einer Lipid-Rekonstitution bei 10 mM CHAPS unilamelläre Liposomen gebildet wurden, in die möglicherweise die Phytoensynthase integriert war. Durch die Rekonstitution der solubilisierten Phytoensynthase sowie durch optimale in-vitro Testbedingungen konnte die spezifische Aktivität der solubilisierten Phytoensynthase um den Faktor 3,5 gesteigert werden.

7. Eine Solubilisierung derjenigen integralen Membranproteine, die Phytoen zu den ungesättigteren Carotinoiden wie Neurosporin, Lycopin, 3,4-Dehydrolycopin und γ -Carotin umsetzen, mit 10 bzw. 75 mmol/l CHAPS führte trotz Lipid-Rekonstitution nur zu einer geringen Syntheseaktivität (etwa 7 %).
8. Die Carotinoidbiosynthese steht bei *Neurospora crassa* unter strikter Photokontrolle. Dabei wird angenommen, daß nach Lichtinduktion über eine Genderepression die Enzyme der Carotinoidbiosynthese de novo synthetisiert werden. Der direkte Nachweis für das Auftreten von spezifischen, lichtinduzierten messenger-RNAs und der dazugehörigen carotinoidsynthetisierenden Proteine kann gegenwärtig noch nicht immunologisch erbracht werden. Um dennoch eine de novo Synthese von lichtinduzierten Proteinen zu bestätigen, die in Zusammenhang mit der Pigmentsynthese stehen, wurden lichtbedingte Veränderungen auf der Ebene der m-RNA und der Membranproteine untersucht.
9. Messenger-RNA wurde zu verschiedenen Zeiten nach Lichtinduktion isoliert und in einem Kaninchenretikulozytenlysat in-vitro translatiert. Die Translationsprodukte wurden über 2-dimensionale SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht.
10. Auf der Ebene der m-RNA trat nach Photoinduktion weder ein Anstieg von Poly A⁺-RNA noch eine Steigerung der

Translationsaktivität auf. Die Analyse der in-vitro translatierten Proteine, die die Aktivität von stadienspezifischen m-RNAs widerspiegeln, ergab, daß im untersuchten pH- und Molekulargewichtsbereich keine Polypeptide verschwinden; vielmehr treten nach Photoinduktion 9 Polypeptide verstärkt auf. Auf Grund früherer Ergebnisse von Akkumulationskinetiken und der Wirkung von Hemmstoffen können von den 9 nach Belichtung verstärkt auftretenden in-vitro translatierten Polypeptide vier mit der Carotinoidbiosynthese in einen Zusammenhang gestellt werden.

11. Auf der Ebene der Membranproteine, die den Hauptanteil der Carotinoidsyntheseaktivität tragen, wurde ein geringer lichtbedingter Anstieg des ^{35}S -Einbaus in Myzel und Membranproteine deutlich. Dies steht in guter Übereinstimmung mit dem vermuteten induktionsbedingten Anstieg der Synthese von lichtregulierten Enzymen der Carotinoidsynthese.
12. Die ^{35}S -markierten, in-vivo translatierten Proteine wurden über 2-dimensionale SDS-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht und ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Dabei zeigte sich, daß nach Belichtung 4 Polypeptide in ihrer Intensität zunehmen. Diese Polypeptide können jedoch auf Grund von Kinetikstudien nicht eindeutig in Korrelation mit der Carotinoidsynthese gesetzt werden.

VI. Literatur

- Apel, K. (1979) Phytochrome-Induced Appearance of mRNA Activity for the Apoprotein of the Light-Harvesting Chlorophyll a/b Protein of Barley (*Hordeum vulgare*). *Eur.J.Biochem.* **97**, 183-188.
- Aviv, H., P. Leder (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on Oligo-thymidylic acid-Cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 1408-1412.
- Barnes, F.J., A.A. Qureshi, E.J. Semmler und J.W. Porter (1973) Prelycopersene Pyrophosphate and Lycopersene. *J.Biol.Chem.* **248**, 2768-2771.
- Batra, P.P. (1971) Mechanism of Light-Induced Carotenoid Synthesis in Nonphotosynthetic Plants. In "Photophysiology", ed. A.C. Giese, Academic Press, New York. **VI**, 47-74.
- Beyer, P., K. Kreuz und H. Kleinig (1980) β -Carotene synthesis in isolated chromoplasts from *Narcissus pseudonarcissus*. *Planta* **150**, 435-438.
- Beyer, P., G. Weiss und H. Kleinig (1985) Solubilization and reconstitution of the membrane-bound carotenogenic enzymes from daffodil chromoplasts. *Eur.J.Biochem.* **153**, 341-346.
- Beyer, P. (1986) CHAPS Mediated Solubilization and Reconstitution of the Carotenogenic Enzymes from Daffodil Chromoplast Membranes. (unveröffentlicht).
- Beyer, P. (1987) In vitro Biosynthese von α - und β -Carotin aus Phytoen in Chromoplasten. Abstracts der 6. Arbeitstagung "Pflanzliche Lipide", Hannover.
- Beyer, P. (1987) Solubilization and Reconstitution of Carotenogenic Enzymes from Daffodil Chromoplast Membranes Using 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane Sulfonate. In "Methods in Enzymology", **148**, 392-400.
- Bindl, E., W. Lang und W. Rau (1970) Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidbiosynthese. IV. Zeitlicher Verlauf der Synthese der einzelnen Carotinoide bei *Fusarium aquaeductum* unter verschiedenen Induktionsbedingungen. *Planta* **94**, 156-174.
- Bohnenberger, E., H. Sander mann (1983) Lipid Dependence of Diacylglycerol Kinase from *Escherichia coli*. *Eur.J.Biochem.* **132**, 645-650.
- Bonner, W.M., R.A. Laskey (1974) A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in poly-

- acrylamid gels. Eur.J.Biochem. 46, 83-88.
- Boschetti, A., E. Sauton-Heiniger, K.J. Clemetson (1978) Two-dimensional Elektrophoresis of Membrane Proteins. In "Membrane Proteins: A Laboratory Manual", ed. A. Azzi, U. Brodbeck, P. Zahler; Springer Verlag, Berlin, p. 3-10.
- Bowman, B.J., C.E. Borgeson, E.J. Bowman (1987) Composition of *N. crassa* Vascular Membranes and Comparison to Endoplasmatic Reticulum, Plasma Membranes and Mitochondrial Membranes. Exp.Mycology 11, 197-205.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem. 72, 248-254.
- Bramley, P.M. and B.H. Davies (1975) Carotene Biosynthesis By Cell Extracts of Mutants of *Phycomyces Blakesleeanus*. Phytochem. 14, 463-469.
- Bramley, P.M., A. Than and B.H. Davies (1977) Alternative Pathways of Carotene Cyclisation in *Phycomyces Blakesleeanus*. Phytochem. 16, 172-174.
- Bramley, P.M. (1985) Carotenogenic enzymes from *phycomyces*. Pure & Appl.Chem. 57, (5), 671-673.
- Bramley, P.M., R.F. Taylor (1985) The solubilisation of carotenogenic enzymes of *Phycomyces blakesleeanus*. Biochim.Biophys.Acta 839, 155-159.
- Britton, G. and T.W. Goodwin (1971) Biosynthesis of Carotenoids. In "Methods in Enzymology", XVII C, Vitamins and Coenzymes, ed. Mc Cormick and L.D. Wright, Academic Press, London. p. 654.
- Britton, G., T.W. Goodwin and N.J. Patel (1980) Carotenoid Biosynthesis by Cultures and Cell-free Preparations of *Flavobacterium R 1560*. In "Methods in Enzymology", 67, 264-270.
- Camara, B. (1985) Carotenogenic enzymes from *Capsicum chromoplasts*. Pure & Appl.Chem. 57, (5), 675-677.
- Camara, B. and O. Dogbo (1986) Demonstration and Solubilization of Lycopene Cyclase from *Capsicum Chromoplast Membranes*. Plant Physiol. 80, 172-174.
- Cerda-Olmedo, E. (1987) Carotene. In "Phycomyces", ed. E. Cerda-Olmedo and E.D. Lipson. Cold Spring Harbor Laboratory. 199-222.
- Chattopadhyay, A. and E. London (1984) Fluorimetric Determination of Critical Micelle Concentration Avoiding Interference from Detergent Charge.

- Anal.Biochem. 139, 408-412.
- Christofferson, R.E., E. Warm and G.G. Laties (1982) Gene expression during fruit ripening in avocado. *Planta* 155, 52-57.
- Clark, I., G. Sandmann, P.M. Bramley (1981) Carotene Biosynthesis with Isolated Photosynthetic Membranes. *FEBS* 140, 203.
- Cocucci, M. and A. Ballarin-Denti (1981) Effect of Polar Lipids on ATPase Activity and Membrane Preparations from Germinating Radish Seeds. *Plant Physiol.* 68, 377-381.
- Cook, N.J., C. Zeilinger, K.-W. Koch and U.B. Kaupp (1986) Solubilization and Functional Reconstitution of the cGMP-dependent Cation Channel from Bovine Rod Outer Segments. *J.Biol.Chem.* 261, 17033-17039.
- De Fabo, E.C., R.W. Harding, W. Shropshire (1976) Action spectrum between 260 and 800 Nanometers for the Photoinduction of Carotenoid Biosynthesis. *Plant Phys.* 57, 440-445.
- De La Concha, A., F.J. Murillo, E.J. Skone and P.M. Bramley (1983) In Vitro Carotenogenesis By Wild Type and Mutants of *Phycomyces Blakesleeana*. *Phytochem.* 22, 441-445.
- De La Guardia, M.D., C.M.G. Aragon, F.J. Murillo and E. Cerdas-Olmedo (1971) A Carotenogenic Enzyme Aggregate in *Phycomyces*: Evidence from Quantitative Complementation. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 68, 2012-2015.
- Dencher, N.A. (1986) Spontaneous Transmembrane Insertion of Membrane Proteins into Lipid Vesicles Facilitated by Short-Chain Lecithins. *Biochem.* 25, 1195-1200.
- Dennis, D.T., C.D. Upper, C.A. West (1965) An Enzymic Site of Inhibition of Gibberellin Biosynthesis by Amo 1618 and other Plant Growth Retardants. *Plant Physiol.* 40, 948.
- Dorsey, J.K., J.A. Dorsey and J.W. Porter (1966) The Purification and Properties of Pig Liver Geranyl Pyrophosphate Synthetase. *J.Biol.Chem.* 241, 5353-5360.
- Dogbo, O., T. Bardat, J. Quennemet and B. Camara (1986) Metabolism of plastid terpenoids: in vitro inhibition of phytoene synthesis by phenethyl pyrophosphate derivatives. *FEBS* 210, 211-215.
- Eiberger, W. (1983) Charakterisierung und Solubilisierung eines membrangebundenen Enzymsystems für die Carotinoidsynthese aus *N. crassa*. Zulassungsarbeit, Universität München.
- El-Jack, M., P.M. Bramley and A. MacKenzie (1987) Carotene Biosynthesis by a Cell Extract of *Aspergillus Giganteus*

- Mut Alba. *Phytochem.* **26**, 2525-2529.
- Fedorcsak, J., L. Ehrenberg (1966) Effects of diethylpyrocarbonate and methyl-methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem.Scand.* **20**, 107.
- Freedman, R.B. (1981) Membrane-bound Enzymes. In "New Comprehensive Biochemistry", **1**, "Membrane structure", ed. J.B. Finean and R.H. Michell, Elsevier North Holland Biochemical Press, Amsterdam, 161-214.
- Gaertner, F.H. and K.W. Cole (1976) The Protease Problem in *Neurospora*. *Arch.Biochem.Biophys.* **177**, 566-573.
- Gerlach, E. und B. Deuticke (1963) *Biochem.Z.* **337**, 477-479.
- Goodwin, T.W. (1967) Terpenoids and Chloroplast Development. in "The Biochemistry of Chloroplasts", **2**, ed. T.W. Goodwin, Academic Press, London, 721-733.
- Goodwin, T.W. (1983) Biosynthesis of Carotenoids in "The Biochemistry of the Carotenoids", **1**, ed. Chapman and Hall, 33-68.
- Graebe, J.E. (1969) The Enzymatic Preparation of ^{14}C -Kaurene. *Planta*, **85**, 171-174.
- Gregonis, D.E. and H.C. Rilling (1974) The Stereochemistry of trans-Phytoene Synthesis. *Biochem.* **13**, 1538-1542.
- Gressel, J. and W. Rau (1983) Photocontrol of Fungal Development. in "Encyclopedia of Plant Physiology" ed. W. Shropshire, Jr. and H. Mohr. **16 B** 603-638.
- Hall, T.C., B.U. Buchbinder, J.W. Pyne, S.M. Sun, F.A. Bliss (1979) Messenger RNA for G1 protein of French bean seeds: cell-free translation and product characterization. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **75**, 3196-3200.
- Hallermeyer, G. and W. Neupert (1974) Lipid Composition of Mitochondrial Outer and Inner Membranes of *N.crassa*. *Hope-Seyler's Physiol.Chem.* **355**, 279-288.
- Harding, R.W. and H.K. Mitchell (1968) The Effect of Cycloheximide on carotenoid biosynthesis in *N.crassa*. *Arch. Biochem.* **128**, 814-818.
- Harding, R.W. (1974) The Effect of Temperature on Photo-induced Carotenoid Biosynthesis in *Neurospora crassa*. *Plant Physiol.* **54**, 142-147.
- Harding, R.H., R.V. Turner (1981) Photoregulation of the Carotenoid Biosynthetic Pathway in Albino and White Collar Mutants of *Neurospora crassa*. *Plant Physiol.* **68**, 745-749.

- Helenius, A. and K. Simons (1972) The Binding of Detergents to Lipophilic and Hydrophilic Proteins. *J.Biol.Chem.* **247**, 3656-3661.
- Helenius, A. and K. Simons (1975) Solubilization of Membranes by Detergents. *Biochim.Biophys.Acta* **415**, 29-79.
- Helenius, A., D.R. McCaslin, E. Fries and C.Tanford (1979) Properties of Detergents. In "Methods in Enzymology", **56**, ed. S. Fleischer and L. Packer, 734-750.
- Hjelmeland, L.M., D.W. Nebert and A. Chrambach (1978) Electrophoresis and Electrofocusing of native Membrane Proteins. In "Electrophoresis 78", Developments in Biochemistry, ed. N. Catsimpoolas, Elsevier North Holland Biochemical Press, **2**, 29-55.
- Hjelmeland, L.M., D.W. Nebert and J.C. Osborne (1983) Sulfo-betaine Derivatives of Bile Acids: Nondenaturing Surfactants for Membrane Biochemistry. *Anal.Biochem.* **130**, 72-82.
- Hjelmeland, L.M. and A. Chrambach (1984) Solubilization of Functional Membrane Proteins. In "Methods in Enzymology", **104**, 305-318.
- Huber-Willer, A. (1982) Untersuchungen über die phototoxischen Wirkungen in *Fus. aquaeductuum* und seine Schutzmechanismen. Dissertation Univ. München.
- Jochum, M. (1977) Untersuchungen zum Induktionsmechanismus der lichtregulierten Carotinoidsynthese bei *Fusarium aquaeductuum*. Dissertation, Univ. München.
- Johnson, J.H., B.C. Reed and H.C. Rilling (1974) Early Photo-induced Carotenogenesis in a *Mycobacterium* Species. **249**, 402-406.
- Jones, B.L. and J.W. Porter (1985) Enzymatic Synthesis of Phytoene. In "Methods in Enzymology", **110**, 209-220.
- Jones, H.D. (1984) Phenylalanine Ammonia-Lyase: Regulation of its Induction and its Role in Plant Development. *Phytochem.* **23**, 1349-1359.
- Kagawa, Y., E. Racker (1971) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. *J.Biol.Chem.* **246**, 5477-5487.
- Kreuz, K., P. Beyer and H. Kleinig (1982) The site of carotenogenic enzymes in chromoplasts from *Narcissus ps.* *Planta* **154**, 66-69.
- Kushwaha, S.C., G. Suzue, C. Subbarayan and J.W. Porter (1974) The Conversion of Phytoene-¹⁴C to Acyclic, Monocyclic

and Dicyclic Carotenes and the Conversion of Lycopene-15,15-³H to Mono- and Dicyclic Carotenes by soluble Enzyme Systems Obtained from Plastids of Tomato Fruits. *J.Biol.Chem.* **245**, 4708-4717.

Kushwaha, S.C., M. Kates and J.W. Porter (1976) Enzymatic synthesis of C₄₀-carotenes by a cell-free preparation from *Halobacterium cutirubrum*. *Can.J.Biochem.* **54**, 816-823.

Lang, W. und W. Rau (1972) Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidbiosynthese. IX. Zum Induktionsmechanismus der carotinoidbildenden Enzyme bei *Fus. aquaeductuum*. *Planta* **106**, 345-354.

Laulhere, J.-P., C. Rozier (1976) One-step extraction of plant nucleic acids. *Plant Sci. Letters* **6**, 237-242.

Lowry, O.H., N.J. Roserough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J.Biol.Chem.* **193**, 265-275.

Lütke-Brinkhaus, F., B. Liedvogel, K.Kreuz and H. Kleinig (1982) Phytoene synthase and Phytoene dehydrogenase associated with envelope membranes from spinach chloroplasts. *Planta* **156**, 176-180.

Lütke-Brinkhaus, F. and H. Kleinig (1987) Carotenoid and chlorophyll biosynthesis in isolated plastids from mustard seedling cotyledons (*Sinapis alba* L.) during etioplast-chloroplast conversion. *Planta* **170**, 121-129.

Machold, O. (1974) Molekulargewichtsbestimmung von Chloroplastenproteinen durch Dodecylsulfat-Gel-elektrophorese. *Biochem.Phys.Pflanzen* **166**, 149-162.

Mans, R.J., G.D. Novelli (1961) Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by filter-paper disc method. *Arch. Bioch. Biophys.* **94**, 48-53.

Mazliak, P., A. Jolliot, A.-M. Justin and J.-C. Kader (1985) Stimulation of Potato Microsomal NADH-Cytochrome c Reductase by acidic Phospholipids. *Phytochem.* **24**, 1163-1168.

Maudinas, B., M.L. Buchholtz, C. Papastephanou, S.S. Katiyar, A.V. Briedis and J.W. Porter (1977) The Partial Purification and Properties of a Phytoene Synthesizing Enzyme System. *Arch.Biochem.Biophys.* **180**,354-362.

M'Batchi, B., D. Pichelin, S. Delrot (1987) Selective Solubilization of Membrane Proteins Differentially Labeled by p-Chloromercuribenzenesulfonic Acid in the Presence of Sucrose. *Plant Physiol.* **83**, 541-545.

Mende, W. (1976) Untersuchungen über die photoregulierten

Schritte in der lichtinduzierten Synthese der Carotinoide und ihrer Vorstufen bei *Fus. aquaeductuum*.
Dissertation, Univ. München.

Mitzka-Schnabel, U. und W. Rau (1977) Composition and photo-induced biosynthesis of the Carotenoids of a protoplast-like *N.crassa* "slime" mutant.
Arch. Microbiol. **111**, 261-263.

Mitzka-Schnabel, U. (1978) Intrazelluläre Lokalisation und photoregulierte Biosynthese der Carotinoide in einem zellfreien System aus *N. crassa*. Dissertation, Univ. München.

Mitzka-Schnabel, U. und W. Rau (1981) Subcellular Site of Carotenoid Biosynthesis in *Neurospora crassa*. *Phytochem.* **20**, 63-69.

Mitzka-Schnabel, U., E. Warm and W. Rau (1984) Light induced changes in the protein pattern translated in vivo and in vitro accompanying carotenogenesis in *N. crassa* and *Fusarium aquaeductuum*. In "Blue Light Effects in Biological Systems", ed. H. Senger, 253-263.

Mohr, H., H. Drumm, H. Kasemir (1974) Licht und Farbstoffe
Ber.Deutsch.Bot.Ges. **87**, 49-69.

Morrison, W.R., L.M. Smith (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetyls from Lipids with boron trifluoride-methanol. *J.Lipid Res.* **5**, 600-608.

Mozer, T.J. (1980) Partial purification and characterization of the m-RNA for α -amylase from barley aleurone layers. *Plant Physiol.* **65**, 834-837.

Newby, A.C. and A. Chrambach (1979) Disaggregation of Adenylate Cyclase during Polyacrylamide-Gel Electrophoresis in Mixture of Ionic and Non-ionic Detergents.
Biochem.J. **177**, 623-630.

O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J.Biol.Chem.* **250**, 4007-4021.

Pelham, H.R.B. and R.J. Jackson (1976) An efficient mRNA dependent translation system from reticulocyte lysates.
Eur.J.Biochem. **67**, 247-256.

Pharmacia: Manual zur Chromatofokussierung (1980),
ed. Pharmacia Fine Chemicals, Schweden.

Porter, J.W., D.G. Anderson (1967) Biosynthesis of carotenes.
Ann.Rev.Plant Physiol. **18**, 197-228.

Porter, J.W. and S.L. Spurgeon (1979) Enzymatic Synthesis of Carotenes. *Pure & Appl. Chem.* **51**, 609-622.

Qureshi, A.A., F.J. Barnes, E.J. Semmler and J.W. Porter (1973)

Biosynthesis of Prelycopersene Pyrophosphate and
Lycopersene by Squalene Synthetase.
J.Biol.Chem. **248**, 2755-2767.

Racker, E., A. Kandrach (1973) Partial Resolution of the
Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation.
J.Biol.Chem. **248**, 5841-5847.

Racker, E. (1979) Reconstitution of Membrane Processes. In
"Methods in Enzymology", **55**, ed. S. Fleischer and
L. Packer, 699-711.

Racker, E., B. Violand, S. O'Neal, M. Alfonzo and J. Telford
(1979) Reconstitution, a Way of Biochemical Research:
Some New Approaches to Membrane-bound Enzymes.
Arch.Biochem.Biophys. **198**, 470-477.

Ragg, H., P.N. Kuhn, K. Hahlbrock (1981) Coordinated
Regulation of 4-Coumarate:CoA Ligase and Phenylalanine
Ammonia-lyase mRNAs in Cultured Plant Cells.
J.Biol.Chem. **296**, 10061-10065.

Rau, W. (1967) Untersuchungen über die lichtabhängige
Carotinoidsynthese: I. Das Wirkungsspektrum von
Fus. aquaeductuum. *Planta* **72**, 14-28.

Rau, W., I. Lindemann, A. Rau-Hund (1968) Untersuchungen über
die lichtabhängige Carotinoidbiosynthese. III. Die
Farbstoffbildung von *Neurospora* in Submerskultur.
Planta **80**, 309.

Rau, W. (1971) Untersuchungen über die lichtabhängige
Carotinoidsynthese: IV. Reversible Unterbrechung der
Reaktionskette durch Cycloheximid und anaerobe Bedin-
gungen. *Planta* **101**, 251-264.

Rau, W. und A. Rau-Hund (1977) Light-dependent carotenoid
biosynthesis. X. Lag-phase after a second illumination
period in *Fus. aquaeductuum* und *N. crassa*. *Planta*
136, 49-52.

Rau, W. (1980) Blue light-induced carotenoid biosynthesis
in microorganisms. In "The Blue Light Syndrome",
ed. H. Senger.

Rau, W. (1985) Mechanism of photoregulation of carotenoid
biosynthesis in plants. *Pure & Appl.Chem.* **57**, 777-784.

Reger, A. (1988) Untersuchungen zur Aufklärung des UV-Blau-
Photorezeptors bei *N. crassa*. Dissertation, Uni.München.

Rhoads, R.E., G.S. McKnight, R.R. Schimke (1973) Quantitative
measurement of ovalbumin messenger ribonucleic acid
activity. *J.Biol.Chem.* **248**, 2031-2039.

Rigaud J.-L., M.T. Paternostre, A. Bluzat (1988)

Mechanisms of Membrane Protein Insertion into Liposomes during Reconstitution Procedures Involving the Use of Detergents. *Biochem.* **27**, 2677-2688.

Rivnay, B. and H. Metzger (1982) Reconstitution of the receptor for immunoglobulin E into liposomes. *J.Biol.Chem.* **257**, 800-808.

Rogers, M.J. and P. Strittmatter (1973) Lipid-Protein Interactions in the Reconstitution of the Microsomal Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Cytochrome b₅ Reductase System. *J.Biol.Chem.* **248**, 800-806.

Rouser, G., S. Fleischer (1967) Isolation, Characterization and Determination of Polar Lipids of Mitochondria. In *Methods in Enzymology*", **10**, ed. R.W. Estabrook and M.E. Pullman. 385-406.

Russ, E., U. Kaiser und H. Sandermann (1988) Lipid-dependent membrane enzymes. *Eur.J.Biochem.* **171**, 335-342.

Sandermann, H. (1982) Lipid-Dependent Membrane Enzymes. *Eur.J.Biochem.* **127**, 123-128.

Scarborough, G.A., R. Addison (1984) On the Subunit Composition of the *Neurospora* Plasma Membrane H⁺-ATPase. *J.Biol.Chem.* **259**, 9109-9114.

Schnarrenberger, C. and H. Mohr (1970) Carotenoid synthesis in mustard seedlings as controlled by phytochrome and inhibitors. *Planta* **94**, 296-307.

Schrott, E.L., W. Rau (1977) Evidence for a photoinduced synthesis of poly (A) containing mRNA in *Fusarium aquaeductum*. *Planta* **136**, 45-48.

Schrott, E.L. (1980) Fluence response relationship of carotenogenesis in *Neurospora crassa*. *Planta* **150**, 174-179.

Scotto, A.W., Zakim, D. (1985) Reconstitution of Membrane Proteins. Spontaneous Association of Integral Membrane Proteins with Preformed Unilamellar Lipid Bilayers. *Biochem.* **24**, 4066-4075.

Seigner, L. (1984) Über den Gehalt an verschiedenen Carotinoiden und deren Biosyntheseweg in den Pilzen *Fus. aquaeductum* und *Neurospora crassa*. Diplomarbeit, Uni. München.

Simonds, W.F., G. Koski, R.A. Streaty, L.M. Hjelmeland, W.A. Klee (1980) Solubilization of active opiate receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **77**, 4623-4627.

Simons, K., A. Helenius, K. Leonard, M. Sarvas and M.J. Gething (1979) Formation of protein micelles from amphiphilic membrane proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **75**, 5306-5310.

- Song, P.S. (1980) Spectroscopic and Photochemical Characterization of Flavoproteins and Carotenoproteins as Blue Light Photoreceptors. In "Blue Light Syndrome" ed. H. Senger, Springer Verlag, Berlin.
- Spurgeon, S.L., R.V. Turner and R.W. Harding (1979) Biosynthesis of Phytoene from Isopentenyl Pyrophosphate by a *Neurospora* Enzyme System. *Arch.Biochem.Biophys.* **195**, 23-29.
- Spurgeon, S.L., N. Sathyamoorthy, J.W. Porter (1984) Isopentenylpyrophosphate Isomerase and Prenyltransferase from Tomato fruit Plastids. *Arch.Biochem.Biophys.* **230**, 446-454.
- Stark, I. (1982) Optimierung eines zellfreien Systems für die Carotinoidsynthese aus *Neurospora crassa*. Zulassungsarb. Uni. München.
- Tanford, C. and J.A. Reynolds (1976) Characterization of Membrane Proteins in Detergent Solutions. *Biochim.Biophys.Acta* **457**, 133-170.
- Van Renswoude, J. and C. Kempf (1984) Purification of Integral Membrane Proteins. In "Methods in Enzymology", **104**, ed. W.A. Jakoby, 329-339.
- Wagner, S.L., W.L. Dean, R.D. Gray (1984) Effect of a Zwitterionic Detergent on the State of Aggregation and Catalytic Activity of Cytochrom P-450_{PM2} und NADPH-Cytochrome P-450 Rductase. *J.Biol.Chem.* **259**, 2390.
- Wrigglesworth, J.M. (1984) Reconstituted Membrane Systems. In "Membrane Processes", ed. G. Benga, H. Baum, F.A. Kummerow. 3-26.
- Zalokar, M. (1955) Biosynthesis of carotenoids in *Neurospora*. Action spectrum of photoactivation. *Arch.Biochem.Biophys.* **56**, 318-325.
- Zalokar, M. (1957) Variations in the production of carotenoids in *Neurospora*. *Arch.Biochem.Biophys.* **70**, 561-567.
- Zimmermann, R. and W. Neupert (1983) Biosynthesis and Assembly of Nuclear Coded Mitochondrial Membrane Proteins in *N. crassa*. In "Methods in Enzymology", **97K**, ed. S.P. Colowick and N.O. Kaplan, 275-285.

Herrn Prof. Dr. W. Rau danke ich für die Überlassung des Themas und für die stets großzügige Förderung dieser Arbeit, sowie für seine hilfreiche Unterstützung in allen wissenschaftlichen und persönlichen Belangen.

Besonderer Dank gilt auch Frau Dr. U. Mitzka-Schnabel für unzählige, hilfreiche Diskussionen und für ihre unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. G. Wanner möchte ich vielfach für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen und Aufnahmen danken.

Herrn Dr. G. Henkelmann spreche hiermit meinen Dank aus für die umfassende Einarbeitung in den Themenkreis "Lipidanalyse", sowie für die durchgeführten gaschromatographischen Untersuchungen bei *Neurospora crassa*.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Frau Luitgardis Seigner und Frau Angelika Reger für viele wertvolle Diskussionen und Ratschläge.

Frl. H. Predel danke ich besonders für die sorgfältige und gewissenhafte Assistenz bei einem Teil der Versuche.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Rau für die langjährige freundschaftliche und stets hilfsbereite Zusammenarbeit.

Und nicht zuletzt danke ich Frau J. Seifert für die Zeichnungen und Herrn K. Liedl für die Photographien dieses Manuskripts.

Lebenslauf

Seigner

Elisabeth Sophia Alexandra

geboren am: 25. November 1957

Geburtsort: Landshut

Familienstand: ledig

1964-1968 Volksschule in Seifriedswörth

1968-1977 Neusprachliches Gymnasium Seligenthal
in Landshut

1975-1977 Kollegstufe

1977 Abitur

1977 Beginn des Studiums der Biologie an der
Ludwig-Maximilians Universität München

Juni 1980 Diplom-Vorprüfung

Mai 1983-1984 Diplomarbeit bei Prof. Dr. W. Rau
am Botanischen Institut der Universität
München

April 1984 Diplom-Hauptprüfung in Biologie:
Hauptfach: Botanik
Nebenfächer: Mikrobiologie
Bodenkunde

Mai 1984 Beginn der Dissertation bei Prof. Dr. W. Rau
seit 1984 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am
Botanischen Institut und Praktikums-
assistentin

